

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

Bioplataformas electroquímicas para la detección de antibióticos en leche

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Felipe Conzuelo Fernández

Directores

José Manuel Pingarrón Carrazón
Ángel Julio Reviejo García
Susana Campuzano Ruiz

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**BIOPLATAFORMAS ELECTROQUÍMICAS PARA LA
DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por:

FELIPE CONZUELO FERNÁNDEZ

Bajo la dirección de los doctores:

José Manuel Pingarrón Carrazón

Catedrático de Universidad (U.C.M.)

Ángel Julio Reviejo García

Catedrático de Universidad (U.C.M.)

Susana Campuzano Ruiz

Profesora Ayudante Doctor (U.C.M.)

MADRID, 2014



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas

Dpto. Química Analítica

Ciudad Universitaria
28040 Madrid
Tfno.: 91.394.43.31
Fax.: 91.394.43.29
E-mail: depquian@quim.ucm.es

DOÑA MARIA ANTONIA PALACIOS CORVILLO, CATEDRÁTICA Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

HACE CONSTAR:

Qué el trabajo titulado **“Bioplataformas electroquímicas para la detección de antibióticos en leche”** ha sido realizado bajo la dirección de los Doctores **José Manuel Pingarrón Carrazón, Ángel Julio Reviejo García y Susana Campuzano Ruiz**, Profesores de dicho departamento, constituyendo la Tesis Doctoral de su autor.

Madrid, 18 de marzo de 2014

Fdo. María Antonia Palacios Corvillo

Fdo. José Manuel Pingarrón Carrazón

Fdo. Ángel Julio Reviejo García

Fdo. Susana Campuzano Ruiz

Fdo. Felipe Conzuelo Fernández

“Do not go where the path may lead,
go instead where there is no path and leave a trail”

- Ralph Waldo Emerson

“Es ist nicht genug zu wissen, man muss auch anwenden;
es ist nicht genug zu wollen, man muss auch tun”

- Johann Wolfgang von Goethe

Índice

Lista de esquemas y figuras	xxiii
Lista de tablas	xxxi

1. SUMMARY

1.1 Introduction	35
1.1.1 Antibiotics and Their use in Veterinary Medicine	35
1.1.2 Presence of Antibiotics Residues in Milk	35
1.1.3 Consequences of the Presence of Antibiotic Residues	36
1.1.4 Regulation	36
1.2 State of the Art and Problem Identification	37
1.3 Aim of this Work	39
1.4 Research Results	41
1.4.1 Magnetobiosensors	41
Magnetobiosensor for Tetracyclines	41
Magnetobiosensor for Sulfonamides	42
Magnetobiosensor for β -lactam Antibiotics	42
1.4.2 Integrated Affinity Biosensors	43
Integrated Biosensor for Sulfonamides	43
Integrated Biosensor for β -lactam Antibiotics	43
1.4.3 Other Analytical Strategies	44
Scanning Electrochemical Microscopy (SECM)	44
Biofuel Cell (BFC)	45
1.4.4 Strategies for the Multiplexed Detection and Determination of Antibiotics Residues	45

Integrated dual Immunosensor for the Simultaneous Determination of Sulfonamides and Tetracyclines _____	45
Affinity Magnetosensor for the Multiplexed Detection of Sulfonamides, Tetracyclines, and β -lactam Antibiotics _____	46
1.5 Milestones _____	47
2. INTRODUCCIÓN	
2.1 Objetivo y Plan de trabajo _____	51
2.2 Antibióticos. Generalidades _____	53
2.2.1 Uso de antibióticos en medicina veterinaria. Presencia de residuos de antibióticos en leche _____	54
Consecuencias del uso inadecuado de antibióticos _____	56
Regulación de la presencia de residuos de antibióticos _____	58
2.2.2 Antibióticos β -lactámicos _____	59
Mecanismo de acción _____	61
Empleo de antibióticos β -lactámicos _____	62
Presencia de antibióticos β -lactámicos en leche _____	63
2.2.3 Sulfonamidas _____	63
Mecanismo de acción _____	64
Empleo de sulfonamidas e importancia de su determinación _____	64
2.2.4 Tetraciclinas _____	65
Mecanismo de acción y desarrollo de resistencia bacteriana _____	67
Uso de las tetraciclinas e importancia de su determinación _____	67
2.3 Inmunoensayos, inmunosensores _____	69
2.3.1 Anticuerpos _____	69
2.3.2 Generalidades sobre inmunoensayos _____	70
Clasificación _____	71
Ventajas ofrecidas _____	72
2.3.3 Inmunosensores _____	72
Inmunosensores electroquímicos _____	73
Inmunosensores piezoeléctricos _____	73

Inmunosensores ópticos _____	73
2.4 Inmovilización de los elementos de reconocimiento biológico _____	74
2.4.1 Inmovilización sobre la superficie transductora _____	74
Inmovilización covalente _____	75
Inmovilización orientada _____	75
2.4.2 Uso de partículas magnéticas _____	77
2.5 Revisión bibliográfica de métodos para la detección/determinación de residuos de antibióticos _____	80
2.5.1 Ensayos comerciales de análisis para la detección de residuos de antibióticos en leche _____	83
2.5.2 Métodos descritos para la determinación de antibióticos β -lactámicos en leche _____	94
2.5.3 Métodos descritos para la determinación de sulfonamidas en leche _____	103
2.5.4 Métodos descritos para la determinación de tetraciclinas en leche _____	107
2.5.5 Métodos descritos para la multidetección de antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias de antibióticos en leche _____	112

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentación _____	121
3.1.1 Aparatos _____	121
3.1.2 Electrodo y accesorios empleados para las medidas electroquímicas _____	121
3.1.3 Otra instrumentación empleada _____	122
3.2 Reactivos y acrónimos _____	123
3.2.1 Antibióticos _____	123
β -lactamas _____	123
Tetraciclinas _____	123
Sulfonamidas _____	123
Otros antibióticos _____	123
3.2.2 Reactivos empleados en la preparación de disoluciones _____	124

3.2.3 Reactivos empleados en la funcionalización de las superficies electródicas	125
3.2.4 Micropartículas ferromagnéticas	125
3.2.5 Inmunorreactivos y trazadores enzimáticos	125
3.2.6 Muestras y materiales de referencia analizados	126
3.2.7 Otros reactivos empleados	126
En la síntesis del LAU-NTA	126
En la hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos	126
En la determinación de la concentración de proteínas	127
En la fabricación de las células de biocombustible	127
Otros	127
3.3 Preparación de disoluciones	128
3.3.1 Disoluciones reguladoras	128
3.3.2 Disoluciones empleadas en las medidas electroquímicas	128
3.3.3 Disoluciones empleadas en la modificación de superficies electródicas	129
3.3.4 Otras disoluciones	129
3.4 Procedimientos experimentales	130
3.4.1 Preparación de los inmunorreactivos empleados en la determinación de sulfonamidas	130
3.4.2 Producción, hiperexpresión y purificación de la PBP	130
3.4.3 Síntesis del lauroilo-NTA	132
3.4.4 Modificación de las superficies electródicas de carbono	132
Activación a intensidad de corriente constante	132
Nanoestructuración con partículas de oro	132
Generación de grupos aldehído	133
Modificación con sales de diazonio del 4-ABA	133
Funcionalización con radicales amino del 4-ABA	133
Funcionalización con derivados alquílicos del NTA	134
3.4.5 Fabricación de los biosensores integrados	134
Inmovilización covalente de anticuerpos sobre electrodos serigrafiados de carbono	134
Inmovilización orientada de anticuerpos sobre electrodos serigrafiados de carbono	135

Inmovilización de la PBP sobre electrodos de carbono	135
3.4.6 Modificación de las partículas magnéticas	135
Magnetosensores para sulfonamidas y tetraciclinas	135
Magnetosensor para antibióticos β -lactámicos	136
Magnetosensor para la detección multiplexada de cefalosporinas, sulfonamidas y tetraciclinas	136
3.4.7 Protocolos de los ensayos de afinidad	137
Inmunoensayos para la determinación de sulfonamidas y tetraciclinas con los sensores integrados	137
Ensayo de afinidad para la determinación de antibióticos β -lactámicos con el biosensor integrado	137
Inmunoensayos para la determinación de sulfonamidas y tetraciclinas con los magnetosensores	137
Ensayo de afinidad para la determinación de antibióticos β -lactámicos con el magnetosensor	138
Ensayo de afinidad para la detección multiplexada de cefalosporinas, sulfonamidas y tetraciclinas con el magnetosensor	138
3.4.8 Fabricación de los ultramicroelectrodos de fibra de carbono	138
3.4.9 Preparación de las inmunoplateformas interrogadas por SECM	139
3.4.10 Preparación de los electrodos empleados en la fabricación de células de biocombustible	140
Biocátodo	140
Bioánodo	140
3.4.11 Medidas electroquímicas	141
Amperometría en disoluciones agitadas	141
Voltamperometría cíclica (CV)	141
Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)	141
Microscopía electroquímica de barrido (SECM)	142
Medidas realizadas con el prototipo de BFC	143
3.4.12 Desorción electroquímica en medio alcalino	143
3.4.13 Hidrólisis de antibióticos β -lactámicos	143
3.4.14 Pretratamiento aplicado a las muestras de leche cruda	143
3.4.15 Deposición enzimática de nanopartículas de plata	144

3.5 Cálculos	145
3.5.1 Curvas de calibrado y características analíticas	145
3.5.2 Otros cálculos realizados	146

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parte I. Biosensores para la determinación de familias individuales de antibióticos

4.1 Magnetobiosensores	151
4.1.1 Determinación de tetraciclinas	151
4.1.1.1 Optimización de las variables experimentales	152
Optimización de las partículas magnéticas	152
Modificación de las ProtG-MBs con antiTC	152
Etapas de competición: Trazador enzimático	154
4.1.1.2 Características analíticas del magnetoinmunosensor desarrollado	154
4.1.1.3 Características analíticas del magnetoinmunosensor desarrollado en leche	155
4.1.1.4 Selectividad del magnetoinmunosensor	159
4.1.1.5 Determinación de tetraciclinas en leche	159
4.1.1.6 Detección rápida de tetraciclinas	160
4.1.1.7 Conclusiones	161
4.1.2 Determinación de sulfonamidas	162
4.1.2.1 Optimización de las variables experimentales	162
Optimización de las partículas magnéticas	163
Modificación de las ProtG-MBs con antiSPY	164
Etapas de competición: Trazador enzimático	164
4.1.2.2 Características analíticas del magnetoinmunosensor desarrollado	165
4.1.2.3 Selectividad del magnetoinmunosensor	166
4.1.2.4 Determinación de sulfonamidas en leche	166
4.1.2.5 Conclusiones	167
4.1.3 Determinación de antibióticos β -lactámicos	168
4.1.3.1 Optimización de las variables experimentales	168

Cantidad de partículas magnéticas _____	169
Modificación de las HisTag-MBs con PBP _____	170
Etapas de competición: Trazador enzimático _____	171
4.1.3.2 Características analíticas del magnetosensor de afinidad _____	172
4.1.3.3 Características analíticas del magnetosensor de afinidad en leche _____	172
4.1.3.4 Selectividad del magnetosensor de afinidad _____	176
4.1.3.5 Respuesta a la forma activa de los antibióticos _____	176
4.1.3.6 Determinación de antibióticos en leche _____	177
4.1.3.7 Conclusiones _____	178
4.2 Biosensores integrados _____	179
4.2.1 Determinación de sulfonamidas _____	179
4.2.1.1 Optimización de la inmovilización de los anticuerpos _____	179
4.2.1.2 Optimización de las variables experimentales _____	183
Funcionalización de las superficies electródicas _____	183
Optimización de las condiciones de medida _____	186
Evaluación de adsorciones inespecíficas _____	187
Optimización de la cantidad de anticuerpo inmovilizado _____	187
Optimización del trazador enzimático _____	188
4.2.1.3 Características analíticas del inmunosensor _____	188
4.2.1.4 Características analíticas del inmunosensor en leche _____	189
4.2.1.5 Selectividad del inmunosensor desarrollado _____	194
4.2.1.6 Determinación de sulfonamidas en leche _____	195
4.2.1.7 Detección rápida de sulfonamidas _____	196
4.2.1.8 Conclusiones _____	197
4.2.2 Determinación de antibióticos β-lactámicos _____	198
4.2.2.1 Inmovilización de la PBP recombinante _____	198
Inmovilización orientada de la proteína recombinante _____	199
4.2.2.2 Optimización de las variables experimentales _____	203
Evaluación de las adsorciones inespecíficas _____	203
Funcionalización con derivados del NTA _____	204
Formación de los complejos metálicos _____	205

Inmovilización de la PBP	206
Optimización del trazador enzimático	207
4.2.2.3 Características analíticas del biosensor de afinidad	208
4.2.2.4 Características analíticas del sensor de afinidad en leche	208
4.2.2.5 Selectividad del biosensor de afinidad desarrollado	210
4.2.2.6 Determinación de antibióticos β -lactámicos en leche	212
4.2.2.7 Reutilización de los sensores de afinidad	212
4.2.2.8 Conclusiones	213
4.3 Comparación de metodologías	215
4.4 Otras estrategias analíticas	217
4.4.1 Microscopía electroquímica de barrido (SECM)	217
4.4.1.1 Caracterización de los ultramicroelectrodos	218
4.4.1.2 Modo generación/recolección: Monitorización de BQ	219
Comportamiento electroquímico del sistema HQ/BQ sobre el microelectrodo de fibra de carbono	219
Curvas de aproximación en dirección z hacia las superficies modificadas	220
Cuantificación de SPY en leche	221
Barrido superficial de las superficies modificadas	223
4.4.1.3 Modo competitivo: Deposición enzimática de nanopartículas de plata	224
Curvas de aproximación en dirección z hacia las superficies modificadas	225
Barrido superficial de las inmunoplateformas	226
4.4.1.4 Conclusiones	229
4.4.2 Célula de biocombustible (BFC)	230
4.4.2.1 Inmunosensor empleado como biocátodo	230
4.4.2.2 Construcción del prototipo de BFC	231
4.4.2.3 Funcionamiento de la BFC	232
4.4.2.4 Determinación de SPY	233
4.4.2.5 Conclusiones	234

Parte II. Estrategias desarrolladas para la multidetección de residuos de diferentes familias de antibióticos

4.5 Inmunosensor integrado dual para la determinación simultánea de sulfonamidas y tetraciclinas _____	237
4.5.1 Optimización de las variables experimentales _____	237
Inmovilización orientada de los anticuerpos _____	238
Proteína G para la inmovilización de los anticuerpos _____	238
Anticuerpos frente a sulfonamidas y tetraciclinas _____	239
Trazadores enzimáticos para el ensayo competitivo _____	240
4.5.2 Selectividad del inmunosensor dual _____	241
4.5.3 Características analíticas del inmunosensor dual _____	242
4.5.4 Análisis de muestras de leche _____	244
4.5.5 Conclusiones _____	245
4.6 Magnetosensor de afinidad para la multidetección de sulfonamidas, tetraciclinas y antibióticos β -lactámicos _____	247
4.6.1 Optimización de las variables experimentales _____	248
Cantidad de partículas magnéticas _____	248
Optimización de las respuestas amperométricas _____	250
Detección simultánea de residuos de antibióticos _____	252
Optimización del tiempo de incubación durante la etapa de competición _____	252
Optimización de la temperatura de incubación durante la etapa de competición _____	254
4.6.2 Funcionamiento del magnetosensor desarrollado _____	254
Respuesta obtenida frente a diferentes antibióticos _____	255
Reproducibilidad de las medidas amperométricas _____	255
Estudio de estabilidad _____	256
4.6.3 Análisis de muestras de leche cruda _____	256
4.6.4 Conclusiones _____	257

5. CONCLUSIONS	259
----------------	-----

6. BIBLIOGRAFÍA	263
-----------------	-----

ANEXOS

Resumen en inglés	291
Símbolos y abreviaturas	295
Symbols and Abbreviations	299
Publicaciones derivadas de la presente Tesis Doctoral	301

Lista de esquemas y figuras

Esquema 4.1. Etapas implicadas en la inmovilización de proteínas mediante la generación de grupos aldehído en la superficie electródica _____	180
Esquema 4.2. Etapas implicadas en la funcionalización de la superficie del SPdCE con 4-ABA _____	180
Esquema 4.3. Funcionalización de la superficie electródica a través de la reacción de diazotación del 4-ABA, que permite la generación de su sal de diazonio, y la posterior reducción de la misma _____	181
Esquema 4.4. Detalles de la química superficial implicada en la inmovilización covalente de anticuerpos mediante la funcionalización de la superficie electródica con 4-ABA y la posterior activación de los grupos carboxílicos empleando el método de los ésteres activos _____	186
Esquema 4.5. Inmovilización de la PBP recombinante a través de su <i>tag</i> de histidinas, mediante la formación de un complejo de coordinación con el NTA-Co ²⁺ . El grupo tiol del derivado de NTA permitió su autoensamblaje sobre superficies de oro _____	199
Esquema 4.6. Representación esquemática del prototipo de célula de biocombustible construida ____	231
Figura 2.1. Sitios de acción de los antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias de antibióticos_	53
Figura 2.2. Estructuras de los principales grupos de antimicrobianos pertenecientes a la familia de antibióticos β -lactámicos _____	60
Figura 2.3. Mecanismo de hidrólisis neutra de las β -lactamas _____	61
Figura 2.4. Similitud estructural entre la estructura básica de los antibióticos β -lactámicos y la secuencia terminal D-alanina-D-alanina del peptidoglicano _____	61
Figura 2.5. Estructura básica de las sulfonamidas _____	63
Figura 2.6. Estructura básica de las tetraciclinas _____	65
Figura 2.7. Estructura tridimensional y figura esquemática de una IgG _____	70
Figura 2.8. Representación esquemática de los principales formatos empleados en inmunoensayos basados en el uso de inmunorreactivos marcados _____	71
Figura 2.9. Versatilidad de las partículas magnéticas para ensayos de bioafinidad _____	78
Figura 3.1. Estructuras del hapteno de inmunización SA1 y del hapteno empleado para la preparación del trazador enzimático SA7 _____	130
Figura 3.2. Análisis de los procesos de producción, inmovilización y purificación de la PBP mediante SDS-PAGE _____	132
Figura 3.3. Separación magnética de las micropartículas modificadas empleadas para la fabricación de magnetosensores _____	136
Figura 3.4. Soporte con imán de Nd empleado para la captura de MBs sobre la superficie de los SPCEs _____	141

Figura 3.5. Representación del montaje empleado para las medidas por SECM	142
Figura 3.6. Célula electroquímica construida para las medidas por SECM	142
Figura 4.1. Representación esquemática del magnetoinmunosensor amperométrico desarrollado para la determinación de tetraciclinas	151
Figura 4.2. Optimización del volumen de ProtG-MBs para la elaboración del magnetoinmunosensor de tetraciclinas	153
Figura 4.3. Optimización de la concentración de antiTC para la modificación de ProtG-MBs	153
Figura 4.4. Optimización de la concentración del trazador enzimático TC-HRP	154
Figura 4.5. Curva de calibrado obtenida con el magnetosensor desarrollado para TC en PBST	155
Figura 4.6. Comparación de las curvas de calibrado obtenidas para TC en PBST y leche entera UHT diluida 1:1 con PBST	156
Figura 4.7. Gráfico de control construido para el estudio de la influencia de los iones Ca^{2+} en las disoluciones de leche analizadas	157
Figura 4.8. Curvas de calibrado obtenidas con el magnetoinmunosensor desarrollado para diferentes tetraciclinas (TC, OTC, CTC y DXC) en leche entera UHT:PBST (1:1)	157
Figura 4.9. Gráfico de control construido para el estudio de la estabilidad de los conjugados MBs-antiTC almacenados en PBS a 4 °C	158
Figura 4.10. Estudio de la selectividad del magnetoinmunosensor para la determinación de tetraciclinas frente a antibióticos potencialmente interferentes (SPY, AMOX, ENRO, CEF, AMP y PENG)	159
Figura 4.11. Comparación de las señales amperométricas obtenidas tras diferentes tiempos de incubación en presencia de la cantidad optimizada de TC-HRP	161
Figura 4.12. Representación esquemática del magnetoinmunosensor amperométrico desarrollado para la determinación de sulfonamidas	162
Figura 4.13. Optimización del volumen de ProtG-MBs para la elaboración del magnetoinmunosensor de sulfonamidas	163
Figura 4.14. Optimización de la concentración de antiSPY para la modificación de ProtG-MBs	164
Figura 4.15. Optimización de la concentración del trazador enzimático SPY-HRP	165
Figura 4.16. Curvas de calibrado obtenidas para SPY en PBST y leche entera UHT:PBST (1:1)	165
Figura 4.17. Estudio de la selectividad del magnetoinmunosensor para la determinación de sulfonamidas frente a antibióticos potencialmente interferentes (AMOX, ENRO, TC, CEF, AMP y PENG)	167
Figura 4.18. Representación esquemática de las etapas implicadas en la construcción del magnetosensor de afinidad para la determinación de residuos de antibióticos β -lactámicos	168
Figura 4.19. Comparación entre respuestas amperométricas tras incubar MBs-PBP en disoluciones de PENG-HRP para el estudio de adsorciones inespecíficas del trazador enzimático	169
Figura 4.20. Optimización del volumen de HisTag-MBs para la elaboración del magnetobiosensor de antibióticos β -lactámicos	170
Figura 4.21. Optimización de la concentración de PBP para la modificación de HisTag-MBs	171
Figura 4.22. Optimización de la concentración del trazador enzimático PENG-HRP	171

Figura 4.23. Curva de calibrado para PENG en disoluciones de P&D suplementado con NaCl 1.0 M	172
Figura 4.24. Curvas de calibrado para diferentes antibióticos β -lactámicos (PENG, AMOX, AMP, CEF, OXA y CLOX) en leche entera UHT diluida 1:1 con P&D	174
Figura 4.25. Gráfico de control construido para el estudio de la estabilidad de los conjugados MBs-PBP almacenados en P&D a 4 °C	175
Figura 4.26. Estudio de la selectividad de la PBP empleada frente a tres antibióticos potencialmente interferentes (SPY, TC y ENRO)	176
Figura 4.27. Respuestas amperométricas obtenidas para disoluciones de leche diluida 1:1 con P&D en ausencia y en presencia de PENG 0.5 μ M antes y después de su hidrólisis	177
Figura 4.28. Representación esquemática del inmunosensor integrado desarrollado para la determinación de sulfonamidas	179
Figura 4.29. Comparación de las pendientes obtenidas para la determinación de H_2O_2 con biosensores fabricados inmovilizando la enzima HRP mediante diferentes protocolos	181
Figura 4.30. Comparación de las señales amperométricas obtenidas para inmunosensores de HRP fabricados inmovilizando antiHRP mediante diferentes protocolos	182
Figura 4.31. Barridos voltamperométricos registrados para la funcionalización de las superficies electródicas con 4-ABA	184
Figura 4.32. Voltamperogramas cíclicos obtenidos sobre 4-ABA-SPdCE en disoluciones de $Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$ a diferentes valores de pH	184
Figura 4.33. Voltamperogramas cíclicos y diagramas de Nyquist obtenidos en la monitorización de las etapas de modificación de los SPdCEs con el antiSPY	185
Figura 4.34. Dependencia de las señales amperométricas obtenidas para el inmunosensor de SPY con el potencial aplicado y el pH de la disolución reguladora de fosfato 0.1 M	186
Figura 4.35. Evaluación de diferentes agentes bloqueantes: BSA 2 % (p/v), caseína 0.2 % (p/v) y leche UHT diluida con PBST (1:1)	187
Figura 4.36. Curva de calibrado y respuestas amperométricas obtenidas para SPY con el inmunosensor en disolución reguladora PBST	189
Figura 4.37. Curvas de calibrado obtenidas para SPY en disoluciones de leche:PBST (1:1) conteniendo tres concentraciones diferentes de trazador enzimático: 1.0, 3.0 y 5.0 μ g mL ⁻¹	190
Figura 4.38. Curvas de calibrado construidas para SPY con el inmunosensor desarrollado en diferentes tipos de leche diluidas 1:1 con PBST	191
Figura 4.39. Curvas de calibrado construidas para SPY con el inmunosensor desarrollado en leche entera UHT después de aplicar diferentes diluciones con PBST	192
Figura 4.40. Curvas de calibrado obtenidas con el inmunosensor desarrollado para diferentes sulfonamidas (SPY, SMR, STZ, SMZ, SDZ, SCP y SAM)	193
Figura 4.41. Gráfico de control construido para el estudio de la estabilidad del inmunosensor almacenando los sensores preparados a 4 °C o a temperatura ambiente	194
Figura 4.42. Evaluación de las respuestas amperométricas frente a disoluciones de los antibióticos PENG, ENRO, TC y CEF en el estudio de selectividad del inmunosensor	195

Figura 4.43. Comparación de las respuestas y señales amperométricas obtenidas con el inmunosensor para disoluciones de leche con diferentes concentraciones de SPY o una mezcla de seis sulfonamidas (SPY, SMR, STZ, SMZ, SDZ y SCP) a la misma concentración total	196
Figura 4.44. Comparación de las señales amperométricas obtenidas tras diferentes tiempos de incubación en presencia de la cantidad optimizada de SPY-HRP	197
Figura 4.45. Representación esquemática de las etapas implicadas en el desarrollo del biosensor de afinidad integrado para la determinación de residuos de antibióticos β -lactámicos	198
Figura 4.46. Barridos sucesivos de desorción electroquímica obtenidos en medio alcalino con electrodos serigrafiados duales de carbono	200
Figura 4.47. Comparación de las señales obtenidas para biosensores preparados por inmovilización de la PBP sobre monocapas de HS-NTA autoensambladas sobre electrodos serigrafiados de oro o capas densas de HS-NTA sobre electrodos serigrafiados de carbono	200
Figura 4.48. Estructuras de los derivados HS-NTA y LAU-NTA	201
Figura 4.49. Diagramas de Nyquist obtenidos sobre SPdCEs sin modificar y modificados con HS-NTA y LAU-NTA	201
Figura 4.50. Señales amperométricas para SPdCEs modificados con LAU-NTA o HS-NTA, Co^{2+} y PBP tras su incubación en disoluciones de leche:P&D (1:1) conteniendo PENG-HRP	202
Figura 4.51. Voltamperogramas cíclicos y diagramas de Nyquist obtenidos en la monitorización de las etapas de modificación de los SPdCEs con la PBP	202
Figura 4.52. Comparación entre respuestas amperométricas en el estudio de adsorciones inespecíficas del trazador enzimático	203
Figura 4.53. Optimización de la concentración de HS-NTA y LAU-NTA para la modificación de SPdCEs	204
Figura 4.54. Optimización del tiempo de incubación de los SPdCEs con HS-NTA	205
Figura 4.55. Comparación de las respuestas obtenidas tras la preparación de los biosensores de afinidad con diferentes cationes metálicos	205
Figura 4.56. Optimización de la concentración de CoCl_2 para la formación de complejos metálicos con HS-NTA	206
Figura 4.57. Optimización de la concentración y tiempo de incubación de la PBP para la elaboración del biosensor de afinidad integrado	207
Figura 4.58. Optimización de la concentración del trazador enzimático PENG-HRP	207
Figura 4.59. Curva de calibrado obtenida para AMP en P&D suplementado con NaCl 0.1 M	208
Figura 4.60. Curvas de calibrado obtenidas para AMP y CEF en leche entera UHT diluida 1:1 con P&D	209
Figura 4.61. Gráfico de control construido para el estudio de estabilidad de los biosensores de afinidad desarrollados SPdCE-HS-NTA- Co^{2+} -PBP, almacenados en seco a 4 °C	210
Figura 4.62. Estudio de la selectividad del biosensor de afinidad desarrollado frente a tres antibióticos potencialmente interferentes (TC, SPY y ENRO)	211
Figura 4.63. Señales amperométricas obtenidas en el estudio de la selectividad del biosensor de afinidad desarrollado frente a antibióticos β -lactámicos hidrolizados	211

Figura 4.64. Señales amperométricas registradas en el estudio de reutilización de las plataformas SPdCE-NTA para la determinación de antibióticos β -lactámicos _____	213
Figura 4.65. Detalles de la química superficial implicada en el inmunoensayo para detección de SPY mediante SECM _____	218
Figura 4.66. Voltamperograma cíclico para $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 5 mM conteniendo KCl 100 mM registrado con un UME de fibra de carbono _____	218
Figura 4.67. Representación esquemática detallando el principio del modo muestra generadora/sonda recolectora empleado en SECM para la detección y cuantificación de residuos de SPY ____	219
Figura 4.68. Voltamperogramas cíclicos obtenidos sobre UMEs de platino y de fibra de carbono para BQ 1 mM y BQ 1 mM + H_2O_2 1 mM _____	220
Figura 4.69. Voltamperograma cíclico obtenido con un UME de carbono en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.0), conteniendo HQ 1 mM y BQ 1 mM _____	220
Figura 4.70. Curva de aproximación en dirección z registrada sobre una región de la inmunoplateforma analizada con SPY-HRP inmovilizada _____	221
Figura 4.71. Curvas de aproximación en dirección z registradas sobre regiones de la inmunoplateforma incubadas con mezclas SPY/SPY-HRP con concentraciones variables de SPY _____	222
Figura 4.72. Curva de calibrado obtenida al representar las intensidades de corriente catódica máximas correspondientes a las diferentes curvas de aproximación en función de la concentración de SPY en las mezclas de competición _____	223
Figura 4.73. Barrido superficial por SECM para cuatro regiones de la inmunoplateforma incubadas con diferentes mezclas de competición SPY/SPY-HRP _____	223
Figura 4.74. Superposición de los barridos realizados en SECM a lo largo del eje x, en la obtención de la imagen superficial representada en la Figura 4.73 _____	224
Figura 4.75. Representación esquemática de la deposición de nAg catalizada por la enzima HRP _____	225
Figura 4.76. Curvas de aproximación en dirección z hacia las superficies interrogadas, registradas mediante la aplicación de diferentes potenciales a la placa de carbono vitrificado _____	225
Figura 4.77. Barridos superficiales por SECM de una región circular con nAg depositadas enzimáticamente. $E_{\text{UME}} = 600 \text{ mV (vs. Ag/AgCl)}$ _____	227
Figura 4.78. Barridos superficiales por SECM de una región circular con nAg depositadas enzimáticamente. $E_{\text{UME}} = 0 \text{ mV (vs. Ag/AgCl)}$ _____	228
Figura 4.79. Barrido superficial por SECM de tres regiones con nAg depositadas enzimáticamente ____	229
Figura 4.80. Detalles del inmunosensor preparado para la determinación de residuos de sulfonamidas empleado como biocátodo en una BFC _____	230
Figura 4.81. Señales cronoamperométricas registradas con los bioelectrodos empleados en la construcción del prototipo de BFC _____	231
Figura 4.82. Representación de la BFC diseñada que permite la determinación de residuos de sulfonamidas en leche mediante control inmunológico _____	232
Figura 4.83. Dependencia de la densidad de potencia con el voltaje de la BFC _____	233

Figura 4.84. Curva de calibrado para SPY construida representando la densidad de potencia medida a 550 mV en función de la concentración de SPY _____	233
Figura 4.85. Representación esquemática del inmunosensor dual desarrollado para la determinación de sulfonamidas y tetraciclinas _____	237
Figura 4.86. Comparación de las señales amperométricas obtenidas tras la inmovilización covalente u orientada de los anticuerpos antiSPY y antiTC _____	238
Figura 4.87. Optimización de la cantidad de ProtG para la inmovilización de anticuerpos _____	239
Figura 4.88. Optimización del tiempo de incubación para la inmovilización de anticuerpos _____	239
Figura 4.89. Optimización de la cantidad de anticuerpo inmovilizado _____	240
Figura 4.90. Optimización de la cantidad de trazadores enzimáticos empleados en el inmunoensayo ____	240
Figura 4.91. Respuestas amperométricas simultáneas registradas en la evaluación de la posible interferencia entre las respuestas analíticas proporcionadas por los electrodos de trabajo del inmunosensor dual _____	241
Figura 4.92. Respuestas amperométricas obtenidas en la evaluación de la selectividad del inmunosensor dual _____	242
Figura 4.93. Curvas de calibrado obtenidas con el inmunosensor dual para SPY y TC en leche entera UHT diluida 1:1 con PBST _____	242
Figura 4.94. Gráficos de control contruidos para el estudio de la estabilidad del inmunosensor dual almacenado en seco a 4 °C _____	244
Figura 4.95. Curva de calibrado obtenida con el inmunosensor dual para OTC en disoluciones de leche entera UHT:PBST (1:1) _____	245
Figura 4.96. Representación esquemática del magnetosensor desarrollado para la multidetección de antibióticos _____	247
Figura 4.97. Dependencia de los valores de intensidad de corriente con la cantidad de ProtG-MBs modificadas con antiSPY _____	249
Figura 4.98. Dependencia de los valores de intensidad de corriente con la cantidad de ProtG-MBs modificadas con antiTC _____	249
Figura 4.99. Dependencia de los valores de intensidad de corriente con la cantidad de HisTag-MBs modificadas con PBP _____	250
Figura 4.100. Dependencia de los valores de intensidad de corriente con la cantidad de PBP inmovilizada sobre las HisTag-MBs _____	251
Figura 4.101. Dependencia de los valores de intensidad de corriente con la concentración de SPY-HRP _____	252
Figura 4.102. Señales amperométricas obtenidas tras la incubación de la mezcla de MBs modificadas en disoluciones de leche en ausencia de antibióticos o conteniendo SPY, TC o CEF a sus LMRs _____	253
Figura 4.103. Dependencia de los valores de intensidad de corriente en estado estacionario con el tiempo de competición en la detección simultánea de residuos de antibióticos _____	253

Figura 4.104. Valores de intensidad de corriente en estado estacionario obtenidos en la detección simultánea de residuos de antibióticos en disoluciones de leche diluida 1:1 con PBST _____	254
Figura 4.105. Valores de intensidad de corriente obtenidos con otros antimicrobianos pertenecientes a las tres familias de antibióticos analizadas a sus respectivos LMRs _____	255
Figura 4.106. Gráfico de control construido para el estudio de la estabilidad de la mezcla de MBs modificadas con los tres receptores biológicos almacenadas a 4 °C en PBS _____	256
Figura 4.107. Señales amperométricas obtenidas con el magnetosensor en leche cruda _____	257

Lista de tablas

Tabla 2.1. LMRs establecidos por la Unión Europea y el <i>Codex Alimentarius</i> para residuos de sulfonamidas, tetraciclinas y antibióticos β -lactámicos en leche	59
Tabla 2.2. Valores de pK_a y pesos moleculares de las principales sulfonamidas	64
Tabla 2.3. Valores de pK_a y pesos moleculares de las principales tetraciclinas	66
Tabla 2.4. Ventajas y limitaciones de los principales métodos de inmovilización de proteínas	74
Tabla 2.5. Afinidad de enlace de las proteínas bacterianas L, A y G por las diferentes especies de inmunoglobulinas y sus subclases	76
Tabla 2.6. Ensayos disponibles comercialmente para la detección de residuos de fármacos antimicrobianos pertenecientes a las familias de las tetraciclinas, sulfonamidas y β -lactamas en leche	85
Tabla 2.7. Comparación de las características analíticas de los diferentes inmunoensayos descritos para la determinación de antibióticos β -lactámicos en leche	97
Tabla 2.8. Comparación de las características analíticas de los ensayos de afinidad basados en el uso de proteínas receptoras para la determinación de antibióticos β -lactámicos en leche	100
Tabla 2.9. Comparación de los métodos electroquímicos descritos para la determinación de antibióticos β -lactámicos en leche	102
Tabla 2.10. Comparación de las características analíticas de los diferentes inmunoensayos descritos para la determinación de sulfonamidas en leche	105
Tabla 2.11. Comparación de las características analíticas de los diferentes inmunoensayos descritos para la determinación de tetraciclinas en leche	108
Tabla 2.12. Comparación de las características analíticas de diferentes sensores basados en el uso de aptámeros para la determinación de tetraciclinas en leche	110
Tabla 2.13. Comparación de los métodos basados en detección electroquímica para la determinación de tetraciclinas en leche	111
Tabla 2.14. Comparación de las características analíticas de diferentes inmunoensayos descritos para la multidetección de antibióticos en leche	113
Tabla 2.15. Comparación de los métodos basados en detección electroquímica descritos para la multidetección de antibióticos en leche	116
Tabla 4.1. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas para TC con el magnetoinmunosensor desarrollado en diversas matrices de leche entera UHT	155
Tabla 4.2. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas para diferentes TCs con el magnetosensor desarrollado en leche entera UHT:PBST (1:1)	158
Tabla 4.3. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas con el magnetoinmunosensor desarrollado para SPY en PBST y leche entera UHT:PBST (1:1)	166
Tabla 4.4. Comparación de las características analíticas de las curvas de calibrado construidas para PENG en diferentes matrices con el magnetosensor de afinidad desarrollado	173

Tabla 4.5. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas con el magnetosensor desarrollado para diferentes antibióticos β -lactámicos en leche entera UHT diluida 1:1 con P&D _____	173
Tabla 4.6. Resultados obtenidos en la determinación de PENG a diferentes niveles de concentración en disoluciones de leche entera UHT diluida con P&D (1:1) _____	177
Tabla 4.7. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas para SPY con el inmunosensor desarrollado en disoluciones de leche:PBST (1:1) conteniendo diferentes concentraciones de SPY-HRP _____	190
Tabla 4.8. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas para SPY con el inmunosensor desarrollado en diferentes disoluciones de leche diluida 1:1 con PBST _____	191
Tabla 4.9. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas para SPY con el inmunosensor desarrollado en disoluciones de leche entera UHT preparadas por diferente dilución con PBST _____	192
Tabla 4.10. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas para diferentes sulfonamidas con el inmunosensor desarrollado en disoluciones de leche UHT diluida con PBST (1:1) ____	193
Tabla 4.11. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas con el biosensor de afinidad desarrollado para AMP y CEF en disoluciones de leche:P&D (1:1) _____	209
Tabla 4.12. Comparación de las características analíticas obtenidas con el magnetoinmunosensor y el inmunosensor integrado desarrollados para la determinación de sulfonamidas, en la determinación de SPY en leche entera UHT diluida con PBST (1:1) _____	216
Tabla 4.13. Comparación de las características analíticas derivadas de las curvas de calibrado construidas para AMP con el biosensor integrado y el magnetosensor de afinidad en disoluciones de leche:P&D (1:1) _____	216
Tabla 4.14. Características analíticas que resultan de las curvas de calibrado construidas con el inmunosensor dual para la determinación amperométrica de SPY y TC en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con PBST _____	243
Tabla 4.15. Comparación de las características analíticas obtenidas con los inmunosensores amperométricos desarrollados para la determinación de SPY en disoluciones de leche entera UHT diluida con PBST (1:1), inmovilizando los anticuerpos de captura antiSPY de manera covalente y de forma orientada empleando proteína G _____	243

1. SUMMARY

1.1 Introduction

1.2 State of the Art and
Problem Identification

1.3 Aim of this Work

1.4 Research Results

1.5 Milestones

1.1 Introduction

1.1.1 Antibiotics and Their use in Veterinary Medicine

Antibiotics are chemical substances extremely active even at low doses, acting against microorganisms like bacteria, fungi or protozoa. These drugs can be classified as bactericidal if they kill microorganisms, or bacteriostatic if they inhibit their growth. As they can prevent the development of bacteria and bacterial infections, antibiotics are commonly used both in humans and animals in the treatment of bacterial diseases.

Most commonly administered drugs in veterinary medicine comprise antibiotics, anti-inflammatories, tranquilizers, and analgesics [Zwald, 2004]. Main uses of antibiotics in veterinary medicine include the treatment of identified illnesses, the prophylactic use in the prevention of several diseases, and the use as grow and yield promoters [Barton, 2000; Armstrong, 2008].

Antimicrobial drugs are widely used in veterinary medicine in the treatment and prevention of several bacterial infections such as mastitis and metritis in cows [Wang, 2009^b]. Mastitis develops with inflammation of the mammary glands, mainly as a consequence of bacterial infections. It is a disease with significant consequences for dairy cattle because it is related to a reduced milk production and changes in milk quality and composition [Galal Abdel Hameed, 2006].

1.1.2 Presence of Antibiotics Residues in Milk

Milk has been perceived as Mother Nature's perfect food, and wholesome enough to feed newborns, infants, and young children [Cullor, 1994]. However, if dairy animals get sick their treatment becomes necessary and sometimes antibiotics are administered but they should be properly used, otherwise antibiotics residues can enter the food chain through contaminated milk and dairy products. Moreover, animals for food production may be legally or illegally exposed to several chemicals, the exposure being sometimes unintentional, through contaminated feed or water [Huet, 2010].

Within food industry, milk is one of the heaviest regulated products; the lipophilic properties of several antibiotics can cause their accumulation in considerable amounts in milk [Reder-Christ, 2011]. Dairy herd treated with antimicrobials yield milk containing residues of these substances, immediately after the drug administration and during a period after that. According to this, individuals under treatment should be excluded from production lines as long as their organisms have not exclude drug residues, assuring the absence of antibiotics in milk and derived products [Sternesjö, 2006]. Milking of dairy herd without compliance of this withdrawal periods may lead to the presence of antimicrobial drugs residues in milk and dairy products.

1.1.3 Consequences of the Presence of Antibiotic Residues

The presence of antibiotic residues in food products is related with undesirable risks in consumers' health, involving direct toxic effects or allergic reactions in sensitized individuals [Stolker, 2005] and even carcinogenesis, teratogenesis or mutagenesis [Wang, 2009^b].

Nevertheless, the main consequence related with the presence of antibiotic residues in food products is the appearance and spread of bacterial resistance. Antibiotics are unique in terms of their targets, because bacteria are living organisms able to react and adapt to environmental responses. Resistant organisms have developed genetic changes acquired through mutations or genetic material transfer from other bacterial strains [Neu, 1992; Davies, 1994]. Bacterial resistance remains even after ceasing antimicrobials administration [Barton, 2000]. As a consequence of inappropriate use of antibacterial drugs, several common infections are more difficult to treat, increasing the mortality rate related to bacterial infections, and also increasing hospitalization periods and requiring more expensive drugs for the treatment of common diseases [Sanvicens, 2011; Choudhury, 2012].

In addition to these negative consequences related with consumers' health, the presence of antibiotic residues is also of great concern in the dairy industry, since they can affect milk quality and inhibit starter cultures of milk derivatives such as cheese and yoghurt [Knecht, 2004], therefore causing important economic losses. Consequently, it is of great importance the control and regulation of antibiotic residues in milk [Mullan, 2003].

1.1.4 Regulation

In order to avoid negative consequences to the consumers as well as economic losses in the dairy industries, several control organisms have established limits of antibiotic residues, implementing also control schedules within the animal production market.

First international regulations for milk and dairy products were set up by the International Dairy Federation, established in 1903 [FIL, 2013]. In 1963, the World Health Organization and the Food and Agriculture Organization of the United Nations created the *Codex Alimentarius*, a regulation for international alimentary practices, setting regulations and recommendations about food safety [CA, 2013].

Since 1990, the European Union established a Community procedure for the statement of Maximum Residue Limits (MRLs), defined as: "the maximum concentration of residue resulting from the use of a veterinary medicinal product which may be accepted by the Community to be legally permitted or recognized as acceptable in or on a food" [EEC 2377/90]. European regulation N° 37/2010 classifies residues and establishes the MRLs of several pharmacologically active substances in edible products from animal origin [EU 37/2010], ensuring the safety of the consumers as well as negligible losses for the dairy industries.

1.2 State of the Art and Problem Identification

In order to determine the presence of antibiotic residues in milk at the MRLs stated by current legislation, there is a need for having appropriate analytical techniques. Along history, residues analysis has evolved allowing obtaining lower and lower LODs, with a high resolution in separation systems and the development of new analytical strategies permitting a simpler and faster identification of residues. Nowadays, different bioanalytical techniques can be used as screening methods in order to identify the presence or absence of residues at the limits stated by legislation.

Without any doubt, chromatographic techniques are the most widely applied in food quality control, allowing identification and quantification of several harmful residues, including antibiotics in milk [Di Corcia, 2002; Balizs, 2003]. Nevertheless, chromatographic methods are relatively expensive, require long and tedious sample pretreatment steps as well as trained personnel, and cannot be applied to field analysis [Cháfer-Pericás, 2010^b]. In order to overcome these disadvantages, and also because of the huge demand in the number of analysis required in food quality control systems, several other techniques have been applied to the analysis of antibiotics in food samples, using chromatographic determinations only as confirmatory analysis of samples suspicious of containing residues at or above established levels.

Among the simplest alternatives for antibiotic residues detection, qualitative or semi-quantitative assays based on the measurement of grow inhibition of bacteria as a consequence of the presence of antimicrobials in the sample, are available. These tests are frequently used in dairies as screening methods [Strasser, 2003^a]. However, main disadvantages include their low specificity, insufficient sensitivity towards various antibiotics and the long time (several hours to few days) required for the analysis [Adrian, 2008].

Nowadays, there is a strong need for high throughput methodologies with a high ability of detection as well as for the multiple detection of antimicrobials residues belonging to different antibiotic families [Huet, 2010]. Antibiotic content monitoring, according with stated legislation requires new technology for the precise and *in situ* quantification of antibiotic residues within different food products, without requiring complex equipment nor trained workers [Cháfer-Pericás, 2010^b].

The advances in biosensor technologies have triggered the development of new and promising methodologies that can be applied for fast, simple and sensitive detection of residues in food [Reder-Christ, 2011]. Biosensors make use of different bioreceptors interacting selectively with target analytes, minimizing sample treatment steps in order to suppress interferences. Their significance is based on their high specificity and sensitivity, allowing the detection of a wide spectrum of analytes in complex samples with a minimum sample treatment, and permitting the development of portable, cost effective, and easy-to-use devices, capable to the multiplexed and automated sample monitoring, all of this in a short time of analysis and with a low consumption of reagents and sample [Ricci, 2007; Cháfer-Pericás, 2010^b; Sanvicens, 2011]. These advantages make biosensors useful analytical tools for potential routine analysis in food and agricultural industries.

1.3 Aim of this Work

The aim of this work was the design and development of novel electrochemical biosensors for multidetection and determination of antimicrobial residues belonging to tetracycline, sulfonamide, and β -lactam antibiotics families in milk. Electrochemical biosensors merge the selectivity of biological recognition reactions with the high sensitivity and simplicity of electroanalytical techniques [Pingarrón, 2003].

As it was commented before, the urge for fast, simple, cost-effective, and reliable analytical systems for antibiotic residues detection in milk drives the continuous search for inexpensive and easy-to-use devices able to assess quality and safety control in compliance with current legislations. In fact, this research was suggested by a Spanish dairy company interested in having fast methodologies to classify milk supplies as complying or not complying with the established MRLs by current European regulations before further processing or rejection of the received milk.

As it will be shown, different electrochemical biosensors were implemented for the achievement of this objective involving both the detection and quantification of individual families of antimicrobial residues, as well as multiplexed systems for the simultaneous detection of antimicrobials belonging to different families. All the developed biosensors were applied to the analysis of antibiotic residues in milk.

1.4 Research Results

The research work achieved the successful preparation and validation of magneto-biosensors and integrated biosensors able to detect and quantify antibiotics residues in milk. Specific antibodies against sulfonamides and tetracyclines as well as a recombinant penicillin binding protein (PBP) were used as affinity biorecognition elements to implement the biosensing systems. Direct competitive assays were used in all cases.

1.4.1 Magnetobiosensors

Magnetobiosensor for Tetracyclines

A disposable amperometric magnetoimmunosensor for the specific detection and quantification of tetracyclines (TCs) residues in milk was developed. The biosensor rationale involved the use of a selective antibody immobilized on the surface of Protein G-functionalized magnetic beads (MBs) and screen-printed carbon electrodes (SPCEs) as electrochemical transducers. Quantification was achieved through a direct competitive immunoassay using a tracer with horseradish peroxidase (HRP) for enzymatic labeling. The electrochemical detection of the enzyme product was carried out after capturing the modified MBs on the SPCE, using hydroquinone (HQ) as electron transfer mediator and H_2O_2 as the enzyme substrate. The amperometric response measured at -0.2 V (vs. the silver pseudo-reference electrode of the SPCE) upon the addition of H_2O_2 was used as transduction signal.

The magnetoimmunosensor performance including the analytical characteristics for the determination of different TCs and the selectivity against other antibiotics were evaluated. The developed methodology allowed quantification in 30 min with detection limits in the low ppb level for four tetracycline antibiotics tested in untreated milk samples (8.9, 1.2, 67, and 0.69 ng mL^{-1} for TC, OTC, CTC, and DXC, respectively). The influence of Ca^{2+} ions content on TCs determination proved to be negligible. A good selectivity against other antibiotic residues that may be detected in milk and dairy products was also observed. Moreover, a 20 days storage stability of the prepared immunoconjugates was demonstrated.

The practical usefulness of the magnetoimmunosensor was proved by analyzing low level-spiked milk samples. The analysis of UHT whole milk samples spiked with 44 ng mL^{-1} TC ($n = 8$) yielded a TC mean content of (43.8 ± 0.5) ng mL^{-1} with a mean recovery of $(99 \pm 1)\%$. Also, the analysis of a milk sample containing a (101 ± 11) $\mu\text{g kg}^{-1}$ certified OTC content yielded a mean concentration of (105 ± 5) $\mu\text{g kg}^{-1}$, with an $\text{RSD}_{n=8}$ of 5.4%.

The possibility of reducing as much as possible the assay time was evaluated. It was shown that the signals obtained upon only 5 min of incubation were still sufficient to distinguish clearly between antibiotic-free milk and milk containing TC at the MRL stated by European legislation.

The obtained results demonstrated that the developed disposable magneto-immunosensor offered a broad specificity for the detection of TCs antibiotics residues in milk at the low ppb concentration level. The developed methodology proved to be rapid, reproducible and selective.

Magnetobiosensor for Sulfonamides

A disposable amperometric magnetoimmunosensor for the specific detection and quantification of sulfonamides residues in milk was developed. The biosensor involved the use of a selective antibody immobilized on the surface of Protein G-functionalized MBs. Quantification was achieved through a direct competitive immunoassay using an HRP labeled analog. The electrochemical detection of the enzyme product was carried out after capturing the modified MBs on a SPCE, using HQ as electron transfer mediator and H_2O_2 as the enzyme substrate. The amperometric response measured at -0.2 V (vs. the silver pseudo-reference electrode of the SPCE) upon the addition of H_2O_2 was used as transduction signal. The magnetoimmunosensor allowed the determination of sulfonamide antibiotics in untreated milk samples in 30 min, with a detection limit of 1.37 ng mL^{-1} for SPY. A good selectivity against other antibiotic residues frequently detected in milk and dairy products was found.

The magnetoimmunosensor was applied to the analysis of UHT whole milk samples spiked with SPY at a 12 ng mL^{-1} level. A mean content of $(12 \pm 1) \text{ ng mL}^{-1}$ with a mean recovery of $(99 \pm 9)\%$ was obtained. The obtained results demonstrated that the developed disposable magnetoimmunosensor exhibited a broad specificity for the detection of sulfonamide antibiotics residues in milk at the low ppb concentration level with a rapid and reproducible methodology.

Magnetobiosensor for β -lactam Antibiotics

An amperometric affinity disposable magnetosensor involving the use of a recombinant PBP and SPCEs, was prepared for the specific detection and quantification of β -lactam antibiotics residues in milk. The PBP was immobilized onto HisTag-MBs and a direct competitive assay using a tracer with HRP for enzymatic labeling was performed. The amperometric response measured at -0.20 V (vs. the Ag pseudo-reference electrode of the SPCE) after the addition of H_2O_2 in the presence of HQ was used as transduction signal.

The affinity sensor performance for the determination of different β -lactams as well as the selectivity against other antibiotics was evaluated. The magnetosensor was successfully applied to the analysis of milk samples spiked at low concentration levels after just a dilution sample treatment. The methodology allowed LODs of 4.0, 14.1, 14.0, 6.6, 13.6, and 19.5 ng mL^{-1} for PENG, AMOX, AMP, CEF, OXA, and CLOX, respectively, to be obtained in untreated milk samples, as well as a good selectivity against other antibiotics residues potentially present in milk and dairy products. Due to the bioreceptor employed, the biosensor was able to detect only the active form of β -lactam antibiotics with high affinities for both penicillins and cephalosporins. The analysis took only 30 min. The storage stability of the MBs-PBP conjugates was observed to be of at least nine days.

The affinity biosensor was applied to the analysis of milk spiked with PENG at four different concentration levels, namely 18, 50, 100, and 200 nM. Measurements by quintuplicate in each milk sample yielded concentrations of (18 ± 2) , (52 ± 6) , (98 ± 8) , and $(210 \pm 20) \text{ nM}$, with recoveries of (99 ± 12) , (105 ± 12) , (98 ± 8) and $(108 \pm 8)\%$, respectively. A modification of the methodology consisting of a two-step assay, involving a 30 min incubation of the MBs-PBP with the milk sample and a further 30 min step where the non-complexed PBP was conjugated with the HRP-labeled analog, allowed amperometric responses in milk containing 4 ppb of PENG, AMOX or AMP which demonstrated the biosensor ability for the detection of β -lactam antibiotics at their MRLs in milk.

1.4.2 Integrated Affinity Biosensors

Integrated Biosensor for Sulfonamides

A disposable integrated amperometric immunosensor using a selective antibody and modified SPCEs was constructed for the detection and quantification of sulfonamide residues in milk. The immunosensor involved a novel antibody immobilization strategy through covalent coupling with a 4-aminobenzoic acid (4-ABA) modified carbon surface. Quantification was achieved by means of a direct competitive immunoassay using an HRP labeled analog. The amperometric response measured at -0.2 V (vs. the silver pseudo-reference electrode of the SPCE) upon the addition of H_2O_2 in the presence of HQ as redox mediator was used as the transduction signal.

The immobilization procedure was fully optimized and characterized, allowing a reliable and reproducible covalent attachment of antibodies on the surface of SPCEs. The immunosensor performance, including the analytical characteristics for the determination of different sulfonamides, the selectivity against other antibiotics, the influence of different kinds of milk and its dilution, was evaluated. The developed methodology achieved detection limits of 0.44, 0.42, 0.96, 8.4, 0.12, and 0.20 ng mL^{-1} for SPY, SMR, STZ, SMZ, SDZ, and SCP, respectively in untreated milk samples and showed a good selectivity against other antibiotics residues that can be present also in milk and dairy products.

A long stability was found for the integrated immunosensors, with amperometric responses without a noticeable decrease for up to 50 days of storage, showing an extremely high stability of the developed immunosensor.

The disposable immunosensor has been successfully applied to the analysis of milk samples spiked with SPY at a 8.7 ng mL^{-1} concentration level with just a dilution as sample treatment. The analysis of ten milk samples yielded an SPY mean content of (8.9 ± 0.3) ng mL^{-1} with a mean recovery of $(103 \pm 3)\%$. Moreover, in compliance with the current legislation establishing an MRL for the total content of sulfonamides in the analyzed sample, the immunosensor was applied to the analysis of mixtures of six sulfonamides. The results demonstrated the ability of the immunosensor to be employed for detecting total sulfonamides in milk.

Moreover, the possibility of reducing the assay time was evaluated. It was shown that the signals measured in only 2.5 min were still sufficient to discriminate between antibiotic-free milk and samples containing 100 ppb (the stated MRL by legislation) of SPY.

Integrated Biosensor for β -lactam Antibiotics

A novel, extremely simple, versatile and fast strategy for the functionalization of carbon electrodes in a single-step with dense layers of chelating agents was implemented for the construction of disposable amperometric affinity biosensors. Such strategy involved the use of a recombinant bacterial Penicillin Binding Protein (PBP) tagged by an N-terminal hexahistidine residue which was immobilized onto Co^{2+} -nitrilotriacetic acid (NTA) modified SPCEs. This work constituted the first report on the successful adsorption of long alkyl chains-NTA derivatives on disposable carbon electrodes and the use of the resulting film for the subsequent coordination of cobalt ions and the histidinyl residues in the tagged PBP. Such procedure allowed the

immobilization of the receptor protein in a reproducible and reversible manner, with a controlled molecular orientation, and keeping entire biological activity. The affinity biosensor was employed for the specific detection and quantification of β -lactam antibiotics residues in milk by means of a direct competitive assay using an HRP-labeled analog. The amperometric response measured at -0.20 V (vs. the Ag pseudo-reference electrode of the SPCE) upon the addition of H_2O_2 in the presence of HQ as redox mediator was used as the transduction signal.

All the variables involved in the affinity biosensor performance and functioning were evaluated and optimized. The biosensor exhibited a good selectivity against other antibiotics residues frequently detected in milk and dairy products, and allowed the detection of both penicillins and cephalosporins, with a non hydrolyzed β -lactam ring, in compliance with the established MRLs for these antibiotics. The storage capability of the integrated affinity sensors showed that no noticeable decrease in the amperometric responses was observed during eight days of storage and kept 91.2% of the original response after eleven days.

The affinity biosensor was able to analyze untreated milk samples in approximately 30 min with LODs values in the low ppb level (0.89 and 0.37 ng mL^{-1} for AMP and CEF, respectively). The analysis of ten UHT whole milk samples spiked with AMP at a 10.5 ng mL^{-1} concentration level yielded an antibiotic mean content of (10.8 ± 0.8) ng mL^{-1} , with a mean recovery of $(103 \pm 8)\%$ and an RSD of 9.9%.

1.4.3 Other Analytical Strategies

In this work, other non-conventional analytical strategies were explored in order to check their suitability to be used for the detection of antibiotics residues in milk. A technique such as Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) and a so relevant strategy nowadays such as the construction of a biofuel cell (BFC) were tested for this purpose. This work was carried out during a research stay in the Analytische Chemie – Elektroanalytik & Sensorik group of the Ruhr Universität Bochum, under the supervision of Prof. Dr. Wolfgang Schuhmann.

Scanning Electrochemical Microscopy (SECM)

SECM was explored as a tool to gain qualitative and quantitative information about the presence of SPY in milk. Sulfonamide immunoplatfroms were fabricated with selective antibodies immobilized on the surface of Protein G-modified glassy carbon plates. A direct competitive immunoassay was performed by incubating milk sample solutions containing an antibiotic HRP-labeled analog, where the SPY antibiotic in the sample competes with a fixed concentration of the labeled analog for the limited number of antigen binding sites of the immobilized antibodies. The obtained immunoplatfroms were interrogated with SECM under two different strategies:

In a first approach, detection was accomplished by using the sample generator/tip collector (GC) mode of SECM. In the proposed scheme, HQ was catalytically converted to benzoquinone (BQ) by the enzyme HRP in the presence of H_2O_2 . The generated BQ was monitored with a carbon fiber tip polarized at -400 mV (vs. Ag/AgCl/3 M KCl). By recording several z-approach curves towards the immunoplatfroms previously incubated with solutions containing different SPY concentrations, the measured reduction currents were plotted as a function of the antibiotic concentration in milk, obtaining a LOD for SPY as low as 0.13 ng mL^{-1} .

SECM images were obtained to show the variability in the recorded current values of four spots for different competition mixture solutions.

In a second approach, the interrogation of the immunoanalytical platform was made after the enzyme-catalyzed deposition of silver particles and using $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ as sensing probe. The modified plates were polarized at different potentials during the SECM feedback readout, where a competition between the tip and the modified carbon plate for the oxidation of ferrocyanide occurred, thus achieving a high resolution in the visualization of the deposited silver-nanoparticle spots.

Biofuel Cell (BFC)

A biofuel cell prototype was constructed by using an immunosensor biocathode as self-powered device and applied for the first time to the determination of sulfonamides antibiotic residues in milk. The biocathode was prepared with a graphite rod electrode modified with Protein G for the immobilization of selective antibodies. After performing a direct competitive immunoassay in milk solutions with a fixed content of an HRP-labeled analog of the antibiotic, the ABTS-mediated reduction of H_2O_2 allowed quantification of antibiotic residues. The other half-cell of the developed BFC consisted of a bioanode where cellobiose dehydrogenase from recombinant *Myrococcus thermophilum* was co-immobilized with toluidine blue and a homobifunctional crosslinker (2,2'-(ethylenedioxy)diethanethiol) on graphite electrode surfaces for the biocatalytic oxidation of lactose in milk to lactobionic acid.

The BFC performance was examined by preparing different biocathodes incubated in milk solutions containing different SPY concentrations. The maximal power density, of approximately $6.9 \mu\text{W cm}^{-2}$, was obtained at around 550 mV (vs. anode). The obtained power densities showed a bell-shaped response with the maximum power density depending on the antibiotic concentration, allowing the use of the BFC as a self-powered biosensor. The construction of a calibration plot with the power densities recorded at a potential difference between the BFC electrodes of 550 mV as a function of SPY concentration in milk allowed a LOD as low as 2.4 ng mL^{-1} to be obtained.

1.4.4 Strategies for the Multiplexed Detection and Determination of Antibiotics Residues

Integrated dual Immunosensor for the Simultaneous Determination of Sulfonamides and Tetracyclines

A novel integrated amperometric dual immunosensor was developed for the simultaneous determination of sulfonamide and tetracycline antibiotics residues in milk. Selective antibodies were immobilized on the surface of Protein G-modified screen-printed dual carbon electrodes (SPdCEs). Protein G was covalently immobilized onto a 4-ABA film grafted on the disposable electrode, and a direct competitive immunoassay using HRP-labeled analogs was performed. The amperometric responses measured at -0.2 V (vs. the silver pseudo-reference electrode of the SPdCE) upon the addition of H_2O_2 in the presence of HQ as mediator were used to monitor the extent of the immunoreactions.

All the variables involved in the performance of the dual immunosensor were optimized. The oriented immobilization of the respective antibodies either using bacterial Protein A or G was considered, with a better result being obtained when Protein G was employed. The developed methodology achieved LODs of 0.097 and 0.858 ng mL⁻¹ for SPY and TC, respectively, in untreated milk samples in 30 min as well as a good selectivity against other antibiotic residues which can be also detected in milk and dairy products. No significant cross-talk between both working electrodes of the dual immunosensor was observed, endorsing the viability of the developed biosensor for multiplexed milk analysis.

The results obtained in the reproducibility studies and the storage stability of the immunoconjugates demonstrated that reproducible amperometric responses were obtained both on the same day and on different days using different immunosensors constructed in the same manner, and that no significant decrease in the amperometric response was observed after up to 18 days of storage.

The usefulness of the dual immunosensor was demonstrated by analyzing milk samples spiked with 9.6 ng mL⁻¹ of SPY and 19.0 ng mL⁻¹ of TC. Mean contents of (9.4 ± 0.4) ng mL⁻¹ for SPY and (18.6 ± 1.3) ng mL⁻¹ for TC, with mean recoveries of (98 ± 4)% and (98 ± 6)%, respectively, were obtained. Furthermore, a reference milk containing a very low certified OTC content (<5 µg kg⁻¹) was also analyzed, yielding an OTC mean content of (4.5 ± 0.4) ng mL⁻¹, with an RSD_{n=5} of 7.9%.

Affinity Magnetosensor for the Multiplexed Detection of Sulfonamides, Tetracyclines, and β-lactam Antibiotics

An amperometric affinity-magnetosensor was developed to perform the multiplexed detection of cephalosporins, sulfonamides and tetracyclines antibiotics residues. The approach relied on the use of a mixture of three specifically modified MBs and application of direct competitive assays using HRP-labeled analogs. The amperometric responses measured at -0.20 V (vs. the Ag pseudo-reference electrode of the SPCE) upon the addition of H₂O₂ in the presence of HQ as redox mediator, were used to monitor the extent of the different affinity reactions.

The magnetosensor performance, including the characteristics regarding the individual determination of different antibiotics and antibiotics mixtures, was evaluated. The developed methodology allowed discrimination between no contaminated UHT and raw milk samples and samples containing antibiotics residues at their MRLs in only 5 minutes. RSD values of 2.9 and 3.7% were calculated for the measurements carried out with magnetosensors used on the same day and on different days, respectively. A storage stability of the modified MBs of 14 days indicated the possibility of their storage until the assay has to be carried out.

The developed magnetosensor was successfully applied to the detection of antibiotics at low concentration in spiked UHT and raw milk samples with a very simple sample treatment in the case of raw milk consisting of heating at 80 °C during 1 min in order to get thermal inactivation of the endogenous lactoperoxidase (LPO). The magnetosensor allowed a clear discrimination between antibiotic-free milk and milk samples spiked with antibiotics residues at or above their established MRL.

1.5 Milestones

The main identified milestones of this work were:

- The implementation of a reproducible, stable, and reliable procedure for immobilization of proteins on carbon surfaces.
- The full study and characterization of a novel and very simple strategy for the immobilization of His-tagged proteins on carbon surfaces.
- The design and development of biosensors for the determination of sulfonamide, tetracycline, and β -lactam antibiotics families in milk.
- The design and development of a dual biosensor for the simultaneous determination of sulfonamides and tetracyclines in milk.
- The analytical interrogation of sulfonamide-sensitive immunoplatfroms using SECM.
- The use of an immunologic-controlled BFC as self-powered biosensor for the determination of antibiotic residues in milk.
- The design and development of a multiplexed biosensor for the detection of antibiotics within sulfonamide, tetracycline, and cephalosporin families at their respective MRLs in milk.
- The implementation of a fast and simple methodology preventing LPO interference in the analysis of raw milk samples.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Objetivo y Plan de trabajo

2.2 Antibióticos. Generalidades

2.3 Inmunoensayos, inmunosensores

2.4 Inmovilización de elementos de
reconocimiento biológico

2.5 Revisión bibliográfica de métodos
para la detección/determinación
de residuos de antibióticos

2.1 Objetivo y plan de trabajo

Los dispositivos biosensores ofrecen ventajas considerables en el análisis de productos alimenticios, como son su capacidad de detectar o cuantificar el analito objeto de estudio sin necesidad de realizar tratamientos complejos de muestra, o con una simple y rápida preparación de la misma, así como la rapidez con la que permiten llevar a cabo los análisis. También es importante destacar que posibilitan el desarrollo de sistemas de multidetección, que permiten la detección simultánea de diversos analitos en un único análisis. Todo ello hace de los biosensores una herramienta analítica útil para realizar análisis rutinarios en la industria agroalimentaria, permitiendo satisfacer tanto las necesidades industriales en materia de calidad, como las legislativas en materia de seguridad.

El **objetivo** de este trabajo fue el **diseño y desarrollo de novedosos sistemas sensores electroquímicos para la multidetección y determinación de residuos de antibióticos correspondientes a las familias de las tetraciclinas, sulfonamidas y β -lactamas, en leche**. Este objetivo surgió a partir de la necesidad planteada por una empresa lechera española para la detección de residuos de estos antibióticos en diversas muestras de leche, con objeto de realizar su clasificación de acuerdo al cumplimiento o incumplimiento de los Límites Máximos de Residuos establecidos por la normativa Europea, para el posterior procesado o rechazo de estas muestras, respectivamente.

Para ello, se implementaron diferentes biosensores electroquímicos para la detección de residuos de antimicrobianos pertenecientes a cada una de estas familias de antibióticos, así como para la multidetección de residuos de antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias de antibióticos.

El objetivo planteado sigue el marcado por la ayuda concedida para la realización de la Tesis Doctoral por el Ministerio de Educación, bajo el programa de Becas para la Formación del Profesorado Universitario (FPU).

El trabajo experimental de esta Tesis Doctoral se realizó en los laboratorios del Grupo de Electroanálisis y (Bio)sensores Electroquímicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid y durante la estancia de investigación disfrutada en el grupo Analytische Chemie – Elektroanalytik & Sensorik, de la Ruhr Universität Bochum, bajo la dirección del Prof. Dr. Wolfgang Schuhmann.

El **plan de trabajo** seguido para conseguir el objetivo global planteado consta de las siguientes etapas, comunes en el desarrollo de los diferentes biosensores:

- Optimización del proceso de fabricación y de los procedimientos implicados en los ensayos de afinidad.
- Selección de las condiciones óptimas de trabajo y detección electroquímica.
- Evaluación de la estabilidad y de las características analíticas del biosensor desarrollado.
- Estudio de interferencias frente a antimicrobianos pertenecientes a otras familias de antibióticos.
- Aplicación a la determinación de los diferentes analitos y validación de la metodología desarrollada.

2.2 Antibióticos. Generalidades

Los antibióticos son sustancias químicas extremadamente activas a bajas dosis que actúan frente a microorganismos tales como las bacterias, hongos o protozoarios. Por su forma de actuar se pueden dividir en agentes bactericidas si matan a los microorganismos o agentes bacteriostáticos si inhiben su crecimiento. Debido a su capacidad para prevenir el desarrollo de microorganismos son usados de forma habitual en el tratamiento de infecciones bacterianas tanto en humanos como en animales.

La era antibiótica surgió con el descubrimiento de los antibióticos β -lactámicos en 1928, cuando Sir Alexander Fleming observó el efecto bactericida del hongo *Penicillium notatum* sobre el crecimiento del *Staphylococcus aureus* [Ho, 1999]. Los antibióticos se usaron por primera vez en el tratamiento de enfermedades en 1939, cuando los médicos Howard Walter Florey y Ernst Boris Chain de la Universidad de Oxford decidieron suministrar penicilina a un enfermo que sufría una infección grave [Mendoza, 2006]; desde entonces los antibióticos han sido utilizados para el tratamiento de diversas infecciones bacterianas. Existen diferentes familias de antimicrobianos, entre las que destacan por su relevancia aminoglicósidos, β -lactamas, macrólidos, polipéptidos, sulfonamidas, tetraciclinas y quinolonas [Stolker, 2005]. Diferentes antibióticos actúan interfiriendo procesos que son esenciales para el crecimiento o replicación de las bacterias, ejerciendo su efecto sobre la pared celular, la membrana plasmática, la síntesis de ácidos nucleicos o las funciones de los ribosomas [Neu, 1996], actuando de manera selectiva al interferir en las funciones vitales de las bacterias sin afectar a las células del organismo huésped [Benito, 2006]. En la **Figura 2.1** se resumen los sitios de acción de los diferentes agentes antimicrobianos.

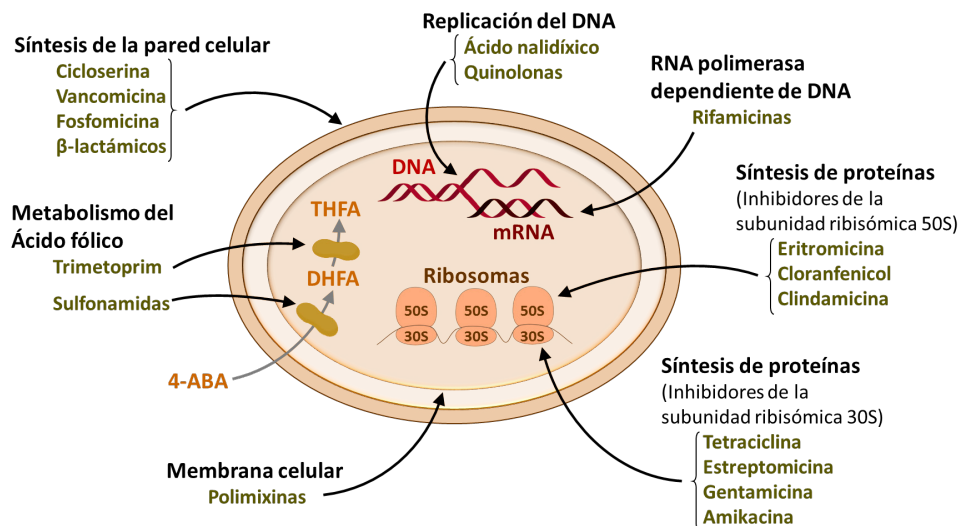


Figura 2.1. Sitios de acción de los antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias de antibióticos. 4-ABA: ácido 4-aminobenzoico; DHFA: ácido dihidrofólico; THFA: ácido tetrahidrofólico. [Neu, 1996; Benito, 2006].

2.2.1 Uso de antibióticos en medicina veterinaria.

Presencia de residuos de antibióticos en leche

Los fármacos más frecuentemente administrados en medicina veterinaria son los antibióticos, seguidos de antiinflamatorios, tranquilizantes y analgésicos [Zwald, 2004]. Los antibióticos han sido usados en medicina veterinaria desde mediados del siglo XX, poco después de su desarrollo [Gustavsson, 2004]. Las principales aplicaciones de los antibióticos en medicina veterinaria incluyen el tratamiento terapéutico de diversas enfermedades identificadas, su uso profiláctico en la prevención de enfermedades y su uso como promotores del crecimiento y del rendimiento en la producción [Barton, 2000; Armstrong, 2008]. Algunas veces, los antibióticos son también usados para prevenir enfermedades que pueden ocurrir en una manada o grupo de animales. Cuando la proporción de animales que padece una enfermedad durante un cierto período de tiempo alcanza un determinado umbral, todos los animales del grupo o manada son tratados sin excepción, debido a la elevada probabilidad de que todos ellos o la mayoría estén infectados [Armstrong, 2008]. En esta práctica conocida como metafilaxis, los fármacos antimicrobianos se suministran a un grupo completo de animales, para tratar a aquellos que padecen la enfermedad a la vez que se previene el desarrollo de la misma en el resto de individuos [Companyó, 2009].

Los fármacos antimicrobianos son ampliamente usados en medicina veterinaria para el tratamiento de diversas infecciones bacterianas, principalmente para la prevención o el tratamiento de mastitis y metritis en las vacas [Wang, 2009^b]. La mastitis consiste en la inflamación de la glándula mamaria, principalmente como consecuencia de infecciones bacterianas y se puede presentar en diversas especies, aunque los cambios inflamatorios de la glándula mamaria son habitualmente identificados en humanos y en el ganado lechero. Las bacterias más comúnmente asociadas a los casos de mastitis incluyen especies de las familias *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Corynebacteriaceae* [Barlow, 2011]. La mastitis es una enfermedad con importantes consecuencias, especialmente en el ganado dedicado a la producción de leche, debido a que está asociada a una disminución en la producción y a cambios en la composición y calidad de la leche [Galal Abdel Hameed, 2006], por lo que el tratamiento con antibióticos es fundamental en su control. Entre los fármacos más comúnmente empleados para el tratamiento de mastitis destaca la penicilina, así como antibióticos pertenecientes a las familias de las sulfonamidas y tetraciclinas [Wang, 2009^b; Andrew, 2010]. Una consecuencia negativa del uso de antibióticos en el tratamiento de mastitis en vacas empleadas para la producción de leche es que una aplicación inadecuada del fármaco puede dar lugar a la contaminación de dicho producto [Knecht, 2004].

Los antibióticos son administrados por vía oral, intramamaria, intrauterina o mediante inyecciones (intramusculares, intravenosas o subcutáneas) [Zwald, 2004]. Aunque la cantidad de antimicrobianos usados en animales destinados a la producción de alimentos no se conoce con exactitud, según la Organización Mundial de la Salud aproximadamente la mitad del total de fármacos antimicrobianos consumidos en 2002 a nivel mundial fueron usados en animales destinados a la producción de alimentos [Font, 2008]. En Estados Unidos se ha estimado que más del 70 % de los antibióticos usados son consumidos por los animales [Qiang, 2004]. En el año 2007 se usaron aproximadamente 12650 toneladas de antibióticos en medicina veterinaria, siendo un 40 % de ellos tetraciclinas [Capita, 2013]. En 2008 se estimó en 5393 toneladas el uso de antibióticos en medicina veterinaria en 25 países de la Unión Europea, siendo las

tetraciclinas, los antibióticos β -lactámicos y las sulfonamidas las familias más utilizadas [Kools, 2008].

Debido a sus efectos en la mejora de la tasa de crecimiento, los fármacos veterinarios han sido usados en gran escala desde hace décadas, siendo administrados a los animales a través del agua o añadiéndolos como aditivos en los alimentos [Stolker, 2005]. El efecto promotor del crecimiento que ejercen los antibióticos se descubrió a finales de los años cuarenta, cuando se observó que los animales alimentados con la masa micelar seca de *Streptomyces aureofaciens* que contenía residuos de clortetraciclina mostraban un mayor incremento de peso, incluso aunque los animales estuvieran sanos [Gratacós, 2007]. El mecanismo de acción de los antibióticos como promotores del crecimiento está relacionado principalmente con su interacción con la microbiota intestinal, ejerciendo un efecto directo sobre la misma, lo que disminuye la competición por los nutrientes, a la vez que se reducen los metabolitos microbianos que disminuyen el crecimiento [Capita, 2013]. Se reducen también las infecciones y la presencia de patógenos oportunistas. Además disminuye el espesor del epitelio intestinal, por lo que aumenta la asimilación de los nutrientes durante la digestión [Barton, 2000]. Los antibióticos ayudan por tanto a incrementar la habilidad de los animales para absorber los nutrientes y alcanzar el peso de mercado en un menor tiempo, pudiendo también contrarrestar los efectos de vivir en hacinamiento y la falta de higiene en los sistemas de ganadería intensiva [Kumar, 2004].

El suministro de fármacos antimicrobianos en prácticas agropecuarias con objeto de incrementar la eficiencia alimentaria ha sido una actividad controvertida a lo largo de la historia ya que ésta práctica puede originar diversas consecuencias negativas, siendo la principal preocupación la propagación de la resistencia bacteriana a los antibióticos. Con objeto de evitar estas consecuencias se ha prohibido el uso de antibióticos como promotores del crecimiento. Los primeros países en efectuar esta prohibición fueron Suecia en 1986 y Dinamarca en 1998 [Companyó, 2009]. La Unión Europea inició la prohibición con la avoparcina en 1997 y desde 2006 prohíbe el uso de todos los antibióticos como aditivos en alimentos, con excepción de los coccidiostatos e histomonostatos [EC 1831/2003]. Sin embargo, además de ser una práctica encubierta común para promover fraudulentamente el crecimiento acelerado de los animales, fuera de la Unión Europea los fármacos antimicrobianos siguen usándose ampliamente como promotores del crecimiento en muchos países [Armstrong, 2008]. De los más de 22.7 millones de kilogramos de antibióticos producidos en Estados Unidos en el año 2000, se ha estimado que aproximadamente un 40 % fue usado en suplementos alimenticios para promover el crecimiento de animales destinados a la producción de alimentos [Kumar, 2004].

Las vacas que han sido tratadas con antibióticos producen leche con residuos de estas sustancias antimicrobianas durante la administración de los mismos y tras un período de tiempo posterior al suministro del fármaco. Debido a ello, los animales bajo tratamiento deben ser excluidos de la producción de leche durante un período de tiempo que asegure que no queden presentes residuos de antibióticos en su organismo o productos derivados [Sternesjö, 2006], variando la duración de estos períodos en función del animal y fármaco empleado. Si las vacas lecheras son ordeñadas muy pronto o si éstas retienen residuos de antibióticos en su organismo durante un período extraordinario de tiempo, diversos residuos de antibióticos pueden estar presentes en la leche y entrar en la producción de sus productos derivados. La falta de conocimiento de estos tiempos o un abuso deliberado en la administración de antimicrobianos puede dar lugar a elevados niveles de residuos de antibióticos en productos derivados para

consumo humano. En la industria alimentaria la leche es uno de los productos regulados más severamente, ya que debido a las propiedades lipofílicas de diversos antibacterianos, éstos se pueden acumular en grandes cantidades en la leche [Reder-Christ, 2011]. La comercialización de leche con residuos de antibióticos, aunque no sea intencional, es ilegal por lo que puede resultar en penalizaciones económicas y criminales [NMPF, 2013]. Para asegurar que la leche está libre de residuos, se ha estipulado la realización de diferentes programas de control [EC 23/1996; EC 882/2004; Companyó, 2009]. Los productores están obligados a ofrecer productos libres de antibióticos y son responsables de asegurar la prevención de residuos ilegales de los mismos [Kantiani, 2009]. El uso irresponsable de los antibióticos en prácticas veterinarias implica el riesgo de su presencia como residuos en alimentos de origen animal. En 2007 la Unión Europea reportó que el 0.27 % de las muestras analizadas (aproximadamente 1300) incumplían la legislación debido a la presencia de agentes antibacterianos, siendo carne, leche y miel las muestras más contaminadas [Companyó, 2009].

Consecuencias del uso inadecuado de antibióticos

Diferentes fármacos antimicrobianos pertenecientes principalmente a las familias de los antibióticos β -lactámicos, sulfonamidas, tetraciclinas y aminoglicósidos son comúnmente administrados, individualmente o a veces combinados, a animales destinados a la producción de alimentos [BCCDC, 2013]. El uso inadecuado de estas sustancias puede dar lugar a la presencia de residuos de antibióticos en productos alimenticios como carne, leche y huevo. La presencia de residuos de sustancias antimicrobianas en los alimentos puede presentar riesgos indeseables en la salud de los consumidores como: efectos tóxicos directos, aparición de reacciones alérgicas en individuos sensibilizados [Stolker, 2005], daños a la flora intestinal de los consumidores [Lamar, 2007] o más serios como carcinogénesis, teratogénesis y mutagénesis [Wang, 2009^b]. La alergia a los antibióticos es una afección muy extendida, siendo las penicilinas los antibióticos que más comúnmente causan reacciones alérgicas, habiéndose observado desde 1969 que la presencia de residuos de penicilina en la leche podía provocar reacciones alérgicas en diversos individuos [Barton, 2000]. Aproximadamente un 5–10 % de la población humana es sensible a las penicilinas u otros antibióticos en concentraciones tan bajas como 1 ppb y sufre reacciones alérgicas [Khaskheli, 2008].

Sin embargo, la principal consecuencia de la presencia de residuos de antibióticos en los alimentos es el surgimiento y diseminación de la resistencia bacteriana. Los antibióticos son fármacos considerados como la última estrategia en el tratamiento de infecciones en humanos, sin embargo su efectividad se ve amenazada debido a su uso abusivo, no sólo en medicina, sino también en agricultura y ganadería [Khaskheli, 2008]. Este hecho se agrava debido a que la resistencia microbiana hacia los antibióticos persiste incluso después de finalizado el período de administración de los mismos. En 1990 Marshall y colaboradores describieron los resultados de un experimento en el que se demostraba que cepas resistentes de *Escherichia coli* (*E. coli*) se propagaban entre diversos animales incluso después de suspender el tratamiento con fármacos antimicrobianos [Barton, 2000]. Aunque el cese del suministro de un antibiótico puede dar lugar a una disminución en la resistencia microbiana frente a dicho fármaco, los niveles de resistencia se recuperan rápidamente si el antibiótico se reintroduce nuevamente y algunas veces la resistencia persiste por largos períodos, incluso en ausencia de exposición al antibiótico, como es el caso de las tetraciclinas.

Como resultado del uso inapropiado de los antibióticos diversas infecciones comunes son más difíciles de tratar, aumentando la tasa de mortalidad debida a enfermedades bacterianas, prolongando los períodos de hospitalización y requiriendo el uso de fármacos más caros para el tratamiento, lo que representa un impacto elevado en la economía de los sistemas sanitarios [Sanvicens, 2011; Choudhury, 2012]. Pese a salvar incontables vidas, los antibióticos se encuentran en peligro de perder su efectividad debido a la resistencia bacteriana [Carlet, 2012].

La gran mayoría de organismos resistentes a los fármacos antimicrobianos han desarrollado esta resistencia como resultado de cambios genéticos adquiridos a través de mutaciones o mediante la adquisición del material genético por transferencia de otras cepas bacterianas [Neu, 1992; Davies, 1994]. Las bacterias son particularmente eficientes en el incremento de los efectos de resistencia debido a su habilidad de multiplicarse rápidamente, transfiriendo genes de unas bacterias a otras mediante transferencia genética lateral [Choudhury, 2012]. Ya en 1945 Sir Alexander Fleming advirtió en una entrevista al New York Times que el uso inapropiado de la penicilina podría derivar en la aparición de formas mutantes bacterianas que podrían causar infecciones más severas [Capita, 2013]. Mientras que en 1941 prácticamente todas las cepas de *Staphylococcus aureus* a nivel mundial eran susceptibles a la penicilina G, hacia 1944 se identificó la capacidad de algunas cepas de destruir la penicilina mediante una β -lactamasa y para 1992 el 95 % de las cepas de *S. aureus* a nivel mundial eran resistentes a la penicilina, ampicilina y otras penicilinas [Neu, 1992]. Cuando los antibióticos son usados de manera inadecuada, por ejemplo durante períodos de tiempo muy cortos o a dosis inadecuadas, aumenta en gran medida la probabilidad de que las bacterias se adapten y repliquen en vez de ser destruidas. Actualmente casi la totalidad de las bacterias implicadas en infecciones bacterianas serias se están haciendo resistentes a los antibióticos, por lo que la resistencia bacteriana constituye una amenaza mundial a la salud pública y es considerada como uno de los mayores problemas en este campo [Capita, 2013].

La actual producción de alimentos facilita el surgimiento y esparcimiento de resistencia a los antibióticos a través del uso intensivo de agentes antimicrobianos y el comercio internacional de animales y alimentos [Choudhury, 2012]. Las bacterias resistentes en animales son transmitidas a los humanos principalmente a través de la cadena alimenticia [Font, 2008], dando lugar a un incremento en el fracaso de los antibióticos para el tratamiento de infecciones humanas comunes [Adrian, 2008].

Además de las consecuencias negativas en la salud de los consumidores, la presencia de residuos de antibióticos presenta un gran impacto en la industria láctea, ya que éstos pueden causar la inhibición de los cultivos iniciadores empleados en la fabricación de productos derivados como queso y yogurt [Knecht, 2004]. De acuerdo con la Agencia Europea de Medicamentos, la presencia de residuos de antibióticos en leche en concentraciones tan bajas como 3 – 6 ppb puede retardar la actividad de los cultivos iniciadores durante la producción de yogurt, reducir el cuajado de la leche causando una maduración incorrecta del queso o disminuir la acidez, con el consecuente cambio de sabor, en la producción de mantequilla [Khaskheli, 2008; Babington, 2012]. Todo esto puede causar pérdidas en la producción o un cambio en la percepción de los productos por parte de los consumidores, disminuyendo por tanto su calidad y valor económico. Estos problemas originan grandes pérdidas económicas en la industria láctea, por lo que es de gran importancia que la leche empleada en la fabricación de productos derivados esté libre de antibióticos [Mullan, 2003].

Regulación de la presencia de residuos de antibióticos

Con objeto de evitar las consecuencias negativas ocasionadas por la presencia de residuos de antibióticos en productos de origen animal destinados a consumo humano y proteger a los consumidores, diferentes organismos reguladores han establecido límites de residuos para diversas sustancias y se han desarrollado planes de control en el mercado de producción alimentaria. El primer organismo formado para establecer normas internacionales para la leche y los productos lácteos fue la Federación Internacional de Lechería (FIL), fundada en 1903. Siendo su principal objetivo, promover la nutrición, calidad y salud a lo largo de la cadena láctea [FIL, 2013]. En 1963, a partir de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), se estableció el *Codex Alimentarius*, que regula a nivel mundial las prácticas alimentarias internacionales y proporciona normas y recomendaciones en materia de seguridad alimentaria [CA, 2013]. Si bien, la aplicación de estas normas es facultativa, generalmente sirven de base para el establecimiento de legislaciones nacionales y regionales.

En materia de seguridad alimentaria, la Unión Europea establece un libre tránsito de comida y alimentos dentro de la Comunidad, a la vez que establece normas para asegurar la salud de los consumidores [EC 178/2002]. En 2002 se creó la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) como organismo científico independiente para evaluar y comunicar los riesgos asociados a la cadena alimentaria [EFSA, 2013]. La Unión Europea estableció en 1990 un procedimiento Comunitario por el que se establecieron Límites Máximos de Residuos (LMRs) definidos como “El contenido máximo de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario autorizada en la Comunidad o reconocida como admisible en un producto alimenticio. Dicho límite se basará en el tipo y en la cantidad de residuos que se considere que no constituyen ningún riesgo toxicológico para la salud humana tal como expresa la dosis diaria admisible” [EEC 2377/90]. Los LMRs fueron definidos en esta legislación para diversos medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal como carne, leche y huevo. Esta legislación fue reemplazada en 2009 por el Reglamento Nº 470/2009, en el que se establecieron los procedimientos Comunitarios para la fijación de los límites de residuos de sustancias farmacológicamente activas en alimentos de origen animal [EC 470/2009] y desde 2010 el Reglamento Nº 37/2010 clasifica los residuos y establece los LMRs de diversas sustancias farmacológicamente activas en productos animales destinados a consumo humano [EU 37/2010]. En su Anexo se recogen todas las sustancias farmacológicamente activas a las que se les ha asignado un LMR en los diferentes productos alimenticios. Desde 1996 en la Unión Europea la monitorización de residuos de fármacos veterinarios ha sido controlada por la Directiva del Consejo 96/23/EC, que describe la frecuencia requerida, el nivel de muestreo, los procedimientos de investigación y la documentación necesaria para el control de residuos, así como las acciones apropiadas a ser tomadas en caso de incumplimiento de la legislación [EC 23/1996].

En la **Tabla 2.1** se resumen los LMRs establecidos por el Reglamento Nº 37/2010 de la Unión Europea y por el *Codex Alimentarius* para antibióticos pertenecientes a las familias de las sulfonamidas, tetraciclinas y β -lactamas, en leche.

Tabla 2.1. LMRs establecidos por la Unión Europea [EU 37/2010] y el *Codex Alimentarius* [CAC/MRL 2-2012] para residuos de sulfonamidas, tetraciclinas y antibióticos β -lactámicos en leche.

Antibiótico	LMR / $\mu\text{g kg}^{-1}$	
	[EU 37/2010]	[CAC/MRL 2-2012]
Amoxicilina (AMOX)	4	4
Ampicilina (AMP)	4	—
Bencilpenicilina (PENG)	4	4
Cefacetrilo (CCT)	125	—
Cefalexina (CFL)	100	—
Cefalonio (CFN)	20	—
Cefapirina (CEF)	60	—
Cefazolina (CZL)	50	—
Cefoperazona (CPZ)	50	—
Cefquinoma (CFQ)	20	—
Ceftiofur (CTF)	100	100
Cloxacilina (CLOX)	30	—
Clortetraciclina (CTC)	100	100
Dicloxacilina (DCLOX)	30	—
Oxacilina (OXA)	30	—
Oxitetraciclina (OTC)	100	100
Sulfonamidas (SAs) (Todas las sustancias pertenecientes a la familia de las sulfonamidas)	100	—
Tetraciclina (TC)	100	100

2.2.2 Antibióticos β -lactámicos

La familia de los antibióticos β -lactámicos está comprendida por diferentes grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas e inhibidores de las betalactamasas [Marín, 2003]. Entre ellos, las penicilinas y cefalosporinas son los grupos más importantes y utilizados. Como se observa en la **Figura 2.2**, esta familia de antibióticos comparte una estructura básica común, estando constituidos por un anillo β -lactámico responsable de su actividad antibacteriana y cadenas laterales variables que proporcionan diferentes propiedades químicas y farmacológicas [Rezaei, 2009].

La estructura básica de las penicilinas consiste en un anillo β -lactámico fusionado a un anillo tiazolidínico de cinco miembros, entre ellas, las penicilinas G y V son activas contra diversas cepas sensibles de bacterias Gram positivas, sin embargo son fácilmente hidrolizadas por la enzima β -lactamasa o penicilinasa, una enzima producida por algunas cepas bacterianas que inactiva a las penicilinas mediante hidrólisis del anillo β -lactámico. Con objeto de obtener antimicrobianos más resistentes se han desarrollado diferentes penicilinas semisintéticas como oxacilina, cloxacilina y dicloxacilina, menos potentes contra microorganismos susceptibles a la penicilina G, pero eficaces frente a bacterias productoras de β -lactamasas, como *Staphylococcus aureus* [Mendoza, 2006]. Se han desarrollado también penicilinas de amplio espectro, como ampicilina y amoxicilina, para extender la utilidad de las penicilinas al tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas [Bacigalupo, 2008].

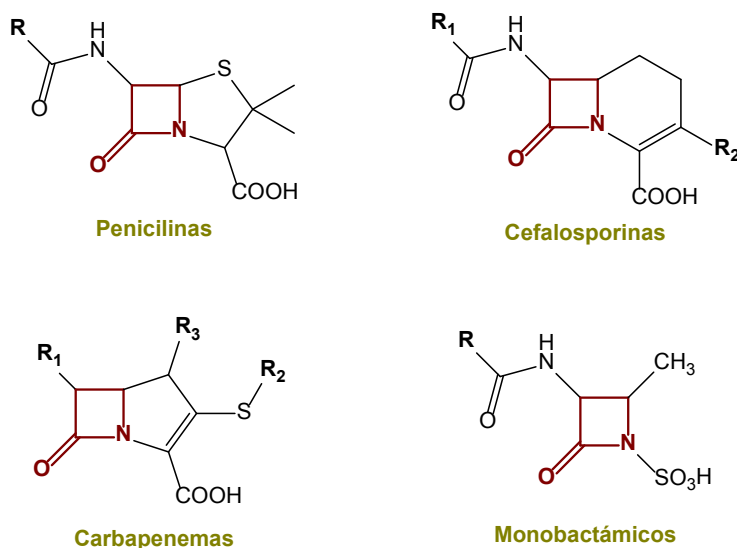


Figura 2.2. Estructuras de los principales grupos de antimicrobianos pertenecientes a la familia de antibióticos β -lactámicos. Se resalta el anillo β -lactámico en las diferentes estructuras.

La historia de las cefalosporinas se remonta a 1948, cuando el médico italiano Giuseppe Brotzu aisló el *Cephalosporium acremonium* a partir de una muestra de agua de mar de la costa de Cerdeña [Mendoza, 2007], notando que algunas sustancias producidas por este hongo eran efectivas contra *Salmonella typhi*, bacteria causante de la fiebre tifoidea. Las cefalosporinas están compuestas por un anillo β -lactámico unido a un anillo de dihidrotiazina de seis miembros; todas ellas son antibióticos semisintéticos, derivados del ácido 7-aminocefalosporánico, con diferentes sustituyentes [Oliveira, 2006]. Las cefalosporinas se introdujeron en el tratamiento antibacteriano en medicina humana en la década de 1960, seguidas de varias generaciones con diversas modificaciones estructurales con la finalidad de aumentar sus propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram negativas [Bremus, 2012].

La inactivación térmica de los antibióticos β -lactámicos sólo ocurre bajo condiciones extremas, requiriendo elevadas temperaturas y períodos de tiempo relativamente largos para su degradación [Roca, 2011]. Sin embargo se pueden degradar por hidrólisis tanto en disolución como en estado sólido. Mientras que su estabilidad en estado sólido depende en gran parte de las condiciones de almacenamiento, diversos estudios han sugerido una elevada estabilidad incluso para hidratos de β -lactamas, lo que permite la fabricación de productos estables a temperatura ambiente [Hickey, 2007]. La principal vía de degradación es la hidrólisis del anillo β -lactámico, que puede ser atacado tanto por H_2O como por OH^- [Pitarch, 1998]. En la Figura 2.3 se representa el mecanismo de hidrólisis neutra de las β -lactamas. La reacción comienza por ataque de una molécula de agua al anillo β -lactámico, seguido de la disociación del enlace amida y transferencia protónica al nitrógeno β -lactámico, dando lugar a la apertura del anillo y la consecuente inactivación del antibiótico.

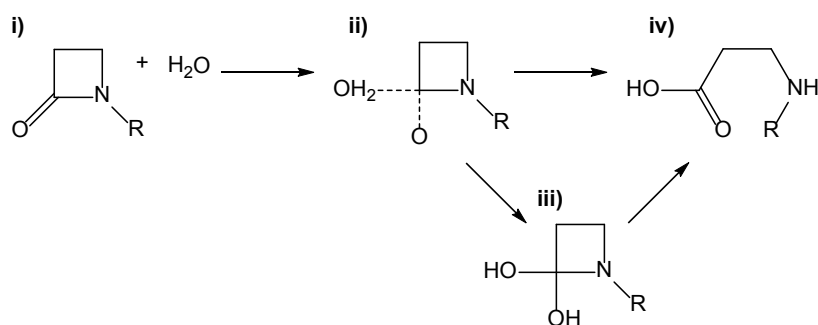


Figura 2.3. Mecanismo de hidrólisis neutra de las β-lactamas. La conversión entre (ii) y (iv) puede ocurrir por vía concertada o a través del intermediario de reacción (iii) [Hickey, 2007].

Mecanismo de acción

Los antibióticos β-lactámicos son agentes bactericidas cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de las enzimas implicadas en la síntesis bacteriana de peptidoglicano y su entrecruzamiento, elemento que proporciona rigidez estructural a la pared bacteriana. Debido a su capacidad de enlazar covalentemente penicilinas y otras β-lactamas, estas enzimas han sido denominadas proteínas fijadoras de penicilina o PBPs (del inglés *Penicillin Binding Proteins*) [Cacciatore, 2004]. El enlace covalente de los antibióticos β-lactámicos a las PBPs origina por tanto una rápida lisis celular y la muerte de la bacteria [Harris, 2000]. Como se representa en la **Figura 2.4**, los antibióticos β-lactámicos presentan una estructura similar a los dos últimos aminoácidos (D-alanina-D-alanina) del pentapéptido constituyente de la estructura básica del peptidoglicano, lo que permite una unión covalente de estos antimicrobianos al sitio activo de dichas enzimas bacterianas [Marín, 2003]. Las PBPs son diferentes en bacterias Gram positivas, Gram negativas y especies anaeróbicas, por lo que la actividad antibacteriana de los antibióticos β-lactámicos está diferenciada [Neu, 1996].

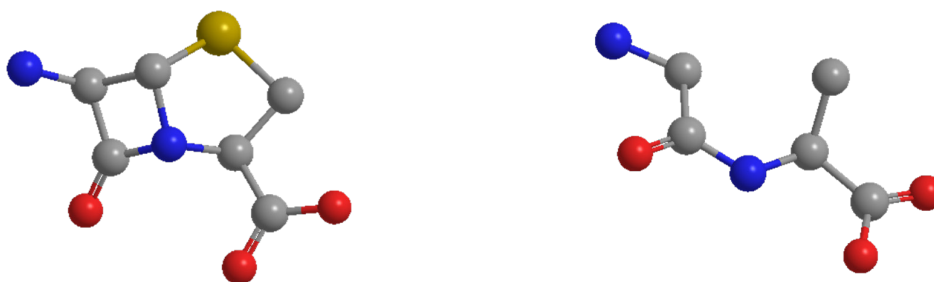


Figura 2.4. Similitud estructural entre la estructura básica de los antibióticos β-lactámicos (izquierda) y la secuencia terminal D-alanina-D-alanina del peptidoglicano (derecha).

Las PBPs son una serie de enzimas halladas en la membrana plasmática de las bacterias, involucradas en las reacciones terminales de la biosíntesis de la capa de peptidoglicano de la pared bacteriana e implicadas además en procesos de crecimiento y división celular y en el mantenimiento de la forma de la célula [Weigel, 1994]. Se clasifican en dos grupos en base a su peso molecular, PBPs de elevado peso molecular (50–100 kDa) y de bajo peso molecular (30–40 kDa). Mientras que las PBPs de elevado peso molecular presentan actividad DD-transpeptidasa y catalizan las etapas finales del entrecruzamiento del peptidoglicano, las de bajo peso molecular presentan actividad DD-carboxipeptidasa y se encargan de controlar el alcance de dicho

entrecruzamiento, limitando el número de unidades de pentapéptido disponibles para la transpeptidación [Cacciatore, 2004]. Las PBPs de elevado peso molecular se dividen a su vez en dos clases, la clase A la componen enzimas bifuncionales que catalizan tanto la transpeptidación como la transglicosilación durante la síntesis de la pared celular, mientras que las de la clase B presentan sólo actividad de transpeptidación [Lamar, 2007].

Las bacterias pueden desarrollar diversos mecanismos de resistencia. En bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, la resistencia intrínseca a las β -lactamas se asocia a modificaciones en la estructura de las PBPs, produciendo especies de elevado peso molecular que exhiben una afinidad reducida por las β -lactamas [Jamin, 1993]. Otros mecanismos de resistencia consisten en la alteración de la permeabilidad celular, impidiendo la entrada de sustancias hidrófilas como son los antibióticos β -lactámicos y la producción de β -lactamasas, enzimas capaces de romper el enlace amida del anillo β -lactámico, con la consiguiente inactivación del antibiótico [Marín, 2003].

Empleo de antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de diversas infecciones bacterianas en acuicultura, ganado, aves de corral y medicina humana [Chen, 2010]. Constituyen la familia de antimicrobianos más ampliamente usada en varios países para el tratamiento de diversas afecciones, como infecciones de la piel, de tejidos blandos y de los tractos respiratorio y urinario [Liu, 2007]. Entre los principales antimicrobianos pertenecientes a la familia de los antibióticos β -lactámicos se encuentran la penicilina G, la ampicilina y la amoxicilina. La bencilpenicilina o penicilina G, es la más comúnmente usada dentro del grupo de las β -lactamas [Gustavsson, 2004]. Se produce en masa mediante un proceso de fermentación empleando cepas de *Penicillium chrysogenum* [Koprowski, 1993], siendo junto con el ácido 6-aminopenicilánico, los productos de partida para la producción de otros antibióticos β -lactámicos. La ampicilina es un antibiótico semisintético, con actividad farmacológica similar a la penicilina G, pero es más estable al pH ácido estomacal, pudiéndose emplear por tanto oralmente y siendo más activa contra ciertas bacterias, por lo que es comúnmente usada para tratar patógenos del tracto urinario, infecciones gastrointestinales, respiratorias y cutáneas. En la industria láctea se usa para combatir a las bacterias causantes de la mastitis y como fármaco profiláctico para aumentar el crecimiento de los animales y el rendimiento de su producción [Bacigalupo, 2008]. La amoxicilina, la única penicilina fenólica, es un antibiótico de espectro moderado, usado para tratar diversas enfermedades en humanos y animales [Rezaei, 2009]. Es frecuentemente utilizada en el tratamiento de infecciones causadas por *Helicobacter pylori*, un patógeno Gram negativo que infecta la mucosa gástrica humana, causando diversas afecciones como gastritis crónica y enfermedad de úlcera péptica, siendo además un factor para la predisposición de adenocarcinoma gástrico [Harris, 2000]. Debido a que después de su administración oral es mejor absorbida [Rezaei, 2009], la amoxicilina es uno de los antibióticos β -lactámicos más frecuentemente usados a nivel mundial en el tratamiento de humanos y animales [Santos, 2008; Ensafi, 2012].

Las cefalosporinas son antibióticos β -lactámicos efectivos contra un amplio espectro de bacterias Gram positivas y Gram negativas. En particular, las cefalosporinas de tercera y cuarta generación como cefquinoma y ceftiofur son frecuentemente usadas en el tratamiento de enfermedades infecciosas en animales destinados a la producción de alimentos, incluyendo vacas lecheras [Oliveira, 2006]. Comparados con otros antibióticos usados en medicina

veterinaria, las cefalosporinas son metabolizadas rápidamente y permanecen poco tiempo en el animal, por lo que resultan antibióticos muy atractivos en la industria láctea. Actualmente, ocho cefalosporinas están aprobadas para el tratamiento de animales destinados a la producción de alimentos en la Unión Europea [Bremus, 2012].

Presencia de antibióticos β -lactámicos en leche

Los antibióticos β -lactámicos se encuentran entre los fármacos antimicrobianos más frecuentemente usados en medicina veterinaria para el tratamiento de diversas enfermedades e infecciones causadas por bacterias [Sternesjö, 2006], siendo esenciales para el control de la mastitis y otras enfermedades infecciosas en vacas lecheras, por lo que constituyen uno de los grupos de antimicrobianos más comúnmente hallado en leche [Setford, 1999; Lamar, 2007].

Con objeto de evitar resistencia bacteriana, reacciones alérgicas e inhibición en los procesos tecnológicos de producción, consecuencias negativas ya comentadas anteriormente y derivadas de la presencia de residuos de esta familia de antibióticos en productos para consumo humano, se han establecido LMRs para todos los antibióticos β -lactámicos comunes como penicilina G, ceftiofur, cefapirina, ampicilina y amoxicilina. Así por ejemplo, se han fijado LMRs para PENG en leche de 4, 5 y 6 $\mu\text{g kg}^{-1}$, por la Unión Europea, la FDA y autoridades canadienses, respectivamente [Setford, 1999].

2.2.3 Sulfonamidas

El descubrimiento de las sulfonamidas ocurrió por casualidad en una fábrica de tintes perteneciente a la empresa IG Farbenindustrie, cuando se observó que un azoderivado usado como colorante en la tinción de lana presentaba actividad antibacteriana [Domagk, 1935; Cohen, 1961]. En 1935 Gerhard Domagk reportó sus estudios sobre las propiedades antibacterianas de uno de estos azoderivados, efectivo en el tratamiento de enfermedades originadas por *Streptococcus* y *Staphylococcus*, y que pronto llegó a ser ampliamente conocido como Prontosil [CHF, 2010], sin embargo, este derivado sólo era efectivo *in vivo* cuando, al ser metabolizado por el organismo, daba lugar al producto activo sulfanilamida [Souza, 2008]. Investigaciones posteriores llevaron al descubrimiento de numerosas sulfonamidas con diferentes aplicaciones.

Las sulfonamidas fueron los primeros fármacos de síntesis usados en el tratamiento de enfermedades bacterianas en medicina humana y veterinaria [Kotouček, 1997]. En la Figura 2.5 se muestra la estructura básica común de la familia química de las sulfonamidas, consistente en un anillo *p*-aminobenzoilo con diversos sustituyentes en el nitrógeno de sulfonamida ($-\text{SO}_2\text{NH}-$), y un grupo amino aromático ($-\text{NHR}^1$) [Pastor-Navarro, 2009].

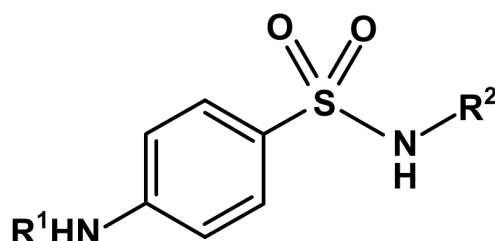


Figura 2.5. Estructura básica de las sulfonamidas.

Las sulfonamidas contienen un grupo amino alcalino (-NHR^1) capaz de ganar un protón (pK_{a1}) y un grupo amida ácido (-NH-) capaz de ceder un protón (pK_{a2}), bajo condiciones de pH específicas [Qiang, 2004]. En la **Tabla 2.2** se resumen las constantes macroscópicas de acidez de las sulfonamidas.

Tabla 2.2. Valores de pK_a y pesos moleculares de las principales sulfonamidas [Qiang, 2004].

Compuesto	$\text{pK}_{a,1}$	$\text{pK}_{a,2}$	Peso molecular / g mol^{-1}
Sulfacloropiridazina	1.9	5.4	284.7
Sulfamerazina	2.1	6.9	264.3
Sulfametazina	2.1	7.5	278.3
Sulfametoxazol	1.8	5.6	253.3
Sulfatiazol	2.0	7.1	255.3

Mecanismo de acción

Las sulfonamidas son antibióticos bacteriostáticos de síntesis con efecto contra la mayoría de las bacterias Gram positivas y Gram negativas, interfiriendo en la ruta metabólica de las mismas [Centi, 2010]. Su actividad quimioterapéutica está asociada a una competición con su análogo estructural, el ácido 4-aminobenzoico (4-ABA), que es un producto intermediario esencial en la obtención de ácido fólico, precursor en la síntesis de ácidos nucleicos [Kotouček, 1997]. Mientras que los animales pueden obtener el ácido fólico a través de la dieta, la mayoría de las células bacterianas sintetizan su propio ácido fólico ya que carecen de un sistema transportador que les permita emplearlo del medio [Neu, 1996; Souza, 2008], por lo que las sulfonamidas actúan inhibiendo competitivamente la conversión del 4-ABA a 7,8-dihidropteroato [Chen, 2009], haciendo que las bacterias empleen el fármaco como sustrato en vez del 4-ABA en la biosíntesis de ácido fólico catalizada enzimáticamente, por lo que éste no se puede formar y el crecimiento normal de la bacteria se ve inhibido [Cohen, 1961; Almeida, 2011].

Empleo de sulfonamidas e importancia de su determinación

Las sulfonamidas son habitualmente usadas debido a su amplio espectro de actividad antibacteriana en el tratamiento de infecciones, prevención de brotes de enfermedades y la mejora en la eficiencia alimentaria y promoción del crecimiento. Por ello, a pesar del descubrimiento y uso de otros antibióticos, las sulfonamidas están entre los agentes antibacterianos más ampliamente empleados tanto en medicina humana como veterinaria, con fines profilácticos y terapéuticos debido a su bajo coste y eficacia en el tratamiento de enfermedades bacterianas [Braga, 2010]. Las sulfonamidas son comúnmente usadas en el tratamiento de infecciones del tracto urinario, bronquitis crónica y enfermedad inflamatoria intestinal. La sulfadiazina es usada en el tratamiento de la toxoplasmosis, y en la prevención de ciertos tipos de meningitis meningocócica [Almeida, 2011]; es usada también en oftalmología en el tratamiento de pacientes sensibles a la penicilina [Braga, 2010]. El sulfametoxazol ha sido usado para el tratamiento de infecciones bacterianas, incluyendo las del tracto respiratorio y urinario, así como en el tratamiento de malaria, infecciones oportunistas en trasplantes y por complicaciones relacionadas con el SIDA [Almeida, 2011; Arvand, 2011]. Además, las sulfonamidas algunas veces son utilizadas como aditivos en los alimentos de animales debido a

que una ingesta prolongada de sulfonamidas puede tener un efecto promotor del crecimiento e incrementar la producción en vacas, cerdos y aves de corral. Sin embargo, si los períodos de retirada apropiados no se cumplen correctamente, la carne o la leche de estos animales pueden estar contaminadas con residuos de sulfonamidas.

Aunque estos antibióticos son eficientes clínicamente, ocasionan problemas serios en la salud humana, como reacciones alérgicas o tóxicas y pueden causar efectos secundarios dando lugar a hepatitis, artritis y reacciones de hipersensibilidad [Won, 2013]. Residuos de sulfametoxazol en alimentos de origen animal pueden producir cáncer tiroideo y otras enfermedades. [Cai, 2012]. Además, se ha descubierto que algunas sulfonamidas pueden ser potencialmente carcinogénicas [Stolker, 2005; Wang, 2006]. Las especies sulfadimetoxina, sulfametazina y sulfatiazol se encuentran entre las sulfonamidas más usadas en el tratamiento del ganado. La mayoría de las sulfonamidas presentan una vida media relativamente larga [Pastor-Navarro, 2009], ocasionando la entrada de residuos a la cadena alimenticia. El uso no autorizado de estos fármacos puede llevar a la presencia no deseada de los mismos en alimentos, por lo que sus residuos en leche, carne, huevo y otros alimentos pueden poner en peligro la salud humana e incluso causar cáncer.

2.2.4 Tetraciclinas

El término tetraciclina se emplea para designar a una familia de antibióticos de origen semisintético descubiertos a mediados del siglo XX [Rodríguez, 1998]. El primer miembro de la familia de las tetraciclinas en ser descubierto fue la clortetraciclina (CTC) en 1948, aislada a partir de *Streptomyces aureofaciens*. En 1950, se introdujo la oxitetraciclina (OTC), obtenida de *Streptomyces rimosus*. En años posteriores se elaboraron otros derivados semisintéticos, como la tetraciclina, propiamente dicha (TC), introducida en 1953 como el derivado de deshalogenación catalítica de la CTC, la doxiciclina (DXC), metaciclina y minociclina [Mendoza, 2008]. Actualmente se comercializan hasta ocho tetraciclinas, de las cuales las especies OTC, TC, CTC y DXC son las más comúnmente empleadas [Oka, 2000].

En la **Figura 2.6** se observa la estructura básica de las tetraciclinas, que consiste en cuatro anillos aromáticos condensados (designados como A, B, C y D), a los que están anclados una variedad de grupos funcionales, la mayoría de ellos comunes a las cuatro tetraciclinas principales.

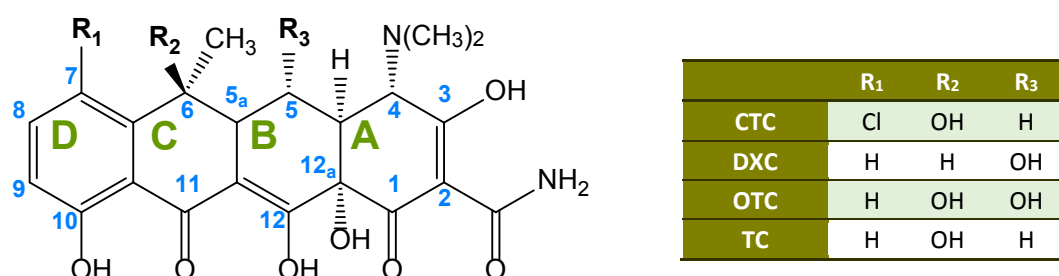


Figura 2.6. Estructura básica de las tetraciclinas, consistente en un núcleo tetracíclico al que se encuentran unidos diferentes sustituyentes, la mayoría de ellos comunes a todas las tetraciclinas. En la tabla se muestran los sustituyentes correspondientes a las principales tetraciclinas.

Las tetraciclinas poseen cuatro grupos funcionales, tanto ácidos como bases de Lewis, que se pueden disociar en función del pH del medio, lo que hace que sean especies anfóteras. Presentan tres constantes macroscópicas de acidez, que se resumen en la **Tabla 2.3**. El primer valor está asociado con la desprotonación del hidroxilo en C3, el segundo valor de pK_a se atribuye a la pérdida del protón en O12 y el tercero al nitrógeno protonado del grupo dimetilamonio [Stezowski, 1976; Wessels, 1998]. Sin embargo, esta asignación exacta de las constantes de disociación sigue siendo controvertida [Anderson, 2005], ya que para compuestos con una estructura química compleja una constante de disociación macroscópica puede estar constituida por diversas constantes de disociación microscópicas [Qiang, 2004].

Tabla 2.3. Valores de pK_a y pesos moleculares de las principales tetraciclinas [Qiang, 2004; Anderson, 2005].

Compuesto	$pK_{a,1}$	$pK_{a,2}$	$pK_{a,3}$	Peso molecular / $g\ mol^{-1}$
CTC	3.3	7.6	9.3	478.9
DXC	3.0	8.0	9.2	444.4
OTC	3.2	7.5	8.9	460.4
TC	3.3	7.8	9.6	444.4

Las tetraciclinas por tanto pueden existir en forma catiónica en medio ácido, en forma aniónica en medio alcalino o como zwitteriones a valores de pH intermedios. Por ejemplo, para el caso de la TC, ésta existe con carga neta cero como zwitterión entre pH 3.3 y 7.8. Es importante destacar que los compuestos anfóteros resisten el cambio del pH de una disolución mediante ionización selectiva, lo que caracteriza el comportamiento de las tetraciclinas en disolución [Jeon, 2008^a]. Pueden existir en diferentes conformaciones, dependiendo de los sustituyentes, la formación de complejos con metales y el disolvente [Wessels, 1998]. Bajo condiciones neutras o ácidas la posición N4 se encuentra protonada, por lo que las tetraciclinas adoptan una conformación angular con el grupo dimetilamonio situado sobre los anillos B-C-D para liberar el impedimento estérico entre el nitrógeno protonado del grupo dimetilamonio (NH₄) y OH12a. En condiciones alcalinas, las tetraciclinas asumen una conformación alargada, con el grupo dimetilamino por debajo del plano definido por los anillos B-C-D, esta conformación se estabiliza por la formación de un fuerte enlace de hidrógeno entre N4 desprotonado y OH12a [Anderson, 2005]. Se ha propuesto que el equilibrio entre estos dos conformeros juega un papel importante en las propiedades farmacocinéticas de estos antibióticos [Wessels, 1998].

Las tetraciclinas forman complejos reversibles con un gran número de especies químicas, principalmente con iones metálicos multivalentes como Ca²⁺ y Mg²⁺ [O'Connor, 2007]. La actividad antibacteriana de las tetraciclinas depende de la presencia de iones metálicos divalentes. Diferentes estudios sugieren que la formación de estos complejos metálicos puede ocurrir en el sistema dicarbonílico y en el grupo amino-alcohol del anillo A, o en los sistemas β -dicetona fenólicos de los anillos B-C-D [Anderson, 2005; Jeon, 2008^a]. Debido a que la complejación ocurre principalmente en sitios básicos y los iones metálicos prefieren O y N donadores, los posibles sitios de unión dependen de la naturaleza del disolvente y el valor de pH. Se han descrito estequiometrías 1:1, 1:2 y 2:1 para los iones metálicos Ca²⁺ y Mg²⁺ unidos a tetraciclina en disoluciones acuosas entre pH 6.5 y 8.5 [Jin, 2007]. Los iones Mg²⁺ son suficientemente pequeños para complejarse con N4-O3, estabilizando la conformación angular de las tetraciclinas. La complejación con Ca²⁺ ocurre en O11-O12 y conlleva a la desprotonación del N del grupo dimetilamonio, induciendo a su conformación alargada [Wessels, 1998].

Las tetraciclinas son solubles en agua, y también muy solubles en alcoholes, dimetilformamida y dimetilsulfóxido, sólo son parcialmente solubles en disolventes no polares (como cloroformo, acetato de etilo y diclorometano) [O'Connor, 2007]. Son muy inestables en medios fuertemente ácidos o alcalinos. En medio alcalino se degradan lentamente [Pastor-Navarro, 2007], mientras que en medios acuosos a pH 2 – 6 pueden presentar epimerización en C4 [Anderson, 2005].

Las tetraciclinas fueron los primeros antibióticos llamados de amplio espectro antibacteriano, son efectivas frente a una amplia variedad de microorganismos tanto Gram negativos como Gram positivos, especialmente frente a *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pneumococcus*, *Gonococcus*, *Cholera*, *Dysentery bacillis*, *Pertussis*, *Rickettsia*, *Chlamydia* y *Mycoplasma* [Oka, 2000; Samanidou, 2007]. Son activas también contra bacterias resistentes a los antibióticos β -lactámicos y han sido diseñadas para actuar muy efectivamente a bajas dosis [Kim, 2009]. Por todo ello han sido ampliamente usadas como agentes antibacterianos tanto en humanos como en medicina veterinaria durante varias décadas. Sin embargo, recientemente su uso clínico se ha limitado por el incremento en la resistencia microbiana generalizada hacia las mismas [Brodersen, 2000].

Aunque han sido diseñadas para ser completamente eliminadas del organismo después de un corto período de residencia, en algunos casos se pueden acumular niveles relativamente altos de residuos en alimentos destinados a consumo humano y pueden provocar reacciones alérgicas en individuos hipersensibles, efectos tóxicos y resistencia bacteriana [Jing, 2010; Cháfer-Pericás, 2010^a].

Mecanismo de acción y desarrollo de resistencia bacteriana

Las tetraciclinas son transportadas activamente dentro de las células bacterianas susceptibles ejerciendo un efecto bacteriostático [Oka, 2000]. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas a nivel ribosómico [Kim, 2010]. Las tetraciclinas se unen a los receptores de la subunidad ribosómica 30S, bloqueando la fijación del aminoacil-tRNA al sitio aceptor del complejo ribosoma-mRNA, evitando así la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena peptídica e inhibiendo por tanto la síntesis de proteínas [Jeon, 2008^b; Mendoza, 2008]. Debido a que el enlace de las tetraciclinas al sitio ribosómico 30S es transitorio, éstos antibacterianos son bacteriostáticos [Neu, 1996]. En estudios cristalográficos se ha detectado la presencia de hasta dos moléculas de tetraciclina en la estructura ribosómica, una localizada cerca del sitio aceptor del tRNA aminoacilado, entre la cabeza y el cuerpo de la subunidad 30S y la segunda molécula de tetraciclina entre tres dominios de RNA, en una región implicada en la regulación de la traducción; se conoce además que la tetraciclina presenta diversas uniones no específicas con ambas subunidades ribosómicas [Berens, 2001].

La resistencia bacteriana a las tetraciclinas puede ser debida a diferentes mecanismos, como son la disminución o pérdida de permeabilidad bacteriana frente al antibiótico, un menor acceso de la tetraciclina al ribosoma bacteriano y la formación de enzimas bacterianas que metabolizan el antibiótico [Brodersen, 2000; Mendoza, 2008].

Uso de las tetraciclinas e importancia de su determinación

Las tetraciclinas presentan actividad frente a casi todas las bacterias Gram positivas y Gram negativas, siendo ampliamente usadas tanto en humanos, como en medicina veterinaria.

En medicina humana, la tetraciclina puede ser usada para tratar enfermedades de la vesícula biliar, derrames pleurales malignos o enfermedades periodontales [Wang, 2009^a], así como en el tratamiento de diversas enfermedades bacterianas gastrointestinales, del tracto respiratorio y lesiones cutáneas [Moeller, 2007]. Se ha descrito también que las tetraciclinas inhiben la amilodogénesis y la infección por priones, asociados con trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer y la encefalopatía espongiforme bovina (enfermedad de las vacas locas), lo que ha estimulado un renovado interés en sus aplicaciones clínicas [Jin, 2007]. Son efectivas para el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus* y *Streptococcus* en pacientes sensibles a la penicilina. Son también prescritas en acuicultura para controlar las infecciones en salmón, bagre y langosta, son rociadas sobre árboles frutales y otras plantas para evitar infecciones, inyectadas en palmeras para tratar infecciones por micoplasmas (amarilleamiento letal), usadas para controlar infecciones de semillas e incluso han sido aplicadas en apicultura [Pastor-Navarro, 2007].

Las tetraciclinas son usadas generalmente para la prevención de enfermedades y tratamiento de infecciones y también como aditivos en alimentos para ser empleadas como promotores del crecimiento en la cría de animales [Jing, 2010; Cháfer-Pericás, 2010^a]. Su efecto promotor del crecimiento está asociado a la inhibición de los microbios intestinales, lo que generalmente lleva a un cambio en el balance de la flora intestinal. Los residuos de antibióticos, a través de sus efectos antimicrobianos, pueden disminuir la actividad del sistema inmune en el tracto intestinal [Ni, 2011].

Las tetraciclinas son baratas, efectivas y fáciles de administrar por vía oral a través del agua y el alimento, por lo que son extremadamente populares como antibióticos veterinarios [Zhang, 2007]. Están autorizadas para su uso en una variedad de animales destinados a la producción de alimentos, incluyendo ganado vacuno, cerdos, ovejas, aves de corral y peces [Masawat, 2007], por lo que se encuentran entre los antibióticos más extensivamente usados como promotores de crecimiento y fármacos terapéuticos en la cría de animales. Por peso, las tetraciclinas son los antibióticos más intensivamente usados en la Unión Europea [Virolainen, 2008]. Entre ellas, OTC, TC, CTC y DXC son las más ampliamente usadas y comercialmente disponibles [Oka, 2000; Traviesa-Alvarez, 2007].

La presencia de residuos de estos antimicrobianos en alimentos presenta efectos dañinos en la salud de los consumidores, como reacciones alérgicas, disfunción renal, amarilleamiento de los dientes, trastornos gastrointestinales, aumento de la presión intracraneal e infecciones en la piel, como rosácea y dermatitis perioral [Palaharn, 2003]. La tetraciclina es conocida por ser un agente hepatotóxico, especialmente para las mujeres embarazadas, lo que implica una seria amenaza a la salud humana [Kim, 2010]. Debido a la formación de complejos con Ca^{2+} , cuando los animales son alimentados con tetraciclinas durante largos períodos, se enriquecen niveles de residuos de antibióticos relativamente elevados en huesos, carne, huevos y leche [Wang, 2009^a].

Debido a estos inconvenientes la determinación de tetraciclinas está estrechamente relacionada con la vida humana. En base a los efectos de las tetraciclinas en la flora intestinal humana, se han establecido LMRs en la UE [Moeller, 2007]. Particularmente, el LMR de diversos antibióticos que pertenecen al grupo de las tetraciclinas (CTC, OTC, TC) se ha establecido en leche en $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

2.3 Inmunoensayos, inmunosensores

Los ensayos de afinidad hacen uso de un receptor adecuado que interacciona con el analito objeto de estudio permitiendo el reconocimiento del mismo. En el desarrollo de estos ensayos de afinidad y sistemas sensores, se han empleado diferentes receptores, entre los que se pueden mencionar anticuerpos, aptámeros, proteínas de afinidad y polímeros de impronta molecular. Aunque el uso de receptores no biológicos para el reconocimiento de diferentes analitos ha dado lugar a interesantes prestaciones analíticas en determinados casos puntuales, actualmente los sistemas basados en receptores biológicos superan muchas veces las características mostradas por los anteriores, permitiendo mejores prestaciones y un destacado funcionamiento analítico. Sin duda, entre los ensayos de afinidad basados en reactivos de origen biológico, aquellos que emplean anticuerpos para el reconocimiento selectivo del analito objeto de estudio son los que han sido más estudiados y explotados y permiten obtener sistemas sensores con interesantes características en su aplicación analítica.

2.3.1 Anticuerpos

La presencia de sustancias extrañas potencialmente dañinas a un organismo desencadena la producción de anticuerpos. Los anticuerpos son un pequeño grupo de glicoproteínas que participan en el sistema inmune enlazándose a estas sustancias extrañas, llamadas antígenos, para marcarlos y que sean posteriormente destruidos. Estas proteínas, pertenecientes a la familia de proteínas globulares denominadas inmunoglobulinas, se encuentran presentes en diversos fluidos de los animales vertebrados, principalmente en el suero sanguíneo [Elgert, 1998].

Existen cinco clases de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) designadas como IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, que difieren entre sí en sus propiedades fisicoquímicas y serológicas. Entre ellas la inmunoglobulina G es la que se encuentra en mayor proporción en la sangre, constituyendo un 80 % ($\sim 12.5 \text{ mg mL}^{-1}$) de los anticuerpos en suero [Elgert, 1998] y es la más comúnmente utilizada en el análisis inmunoquímico. La estructura básica de la IgG se representa en la **Figura 2.7**. Mediante proteólisis parcial con papaína, la inmunoglobulina se puede romper en tres fragmentos de aproximadamente 50 kDa; dos de estos fragmentos presentan los sitios de unión al antígeno, por lo que son denominados Fab (*antigen binding*), el tercer fragmento no presenta unión al antígeno y se denomina Fc (ya que cristaliza fácilmente). Como se observa en la **Figura 2.7**, la IgG está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas ligeras (L) de 25 kDa y dos cadenas pesadas (H) de 50 kDa. Cada cadena L se une a una cadena H mediante un puente de disulfuro, mientras que las cadenas H también están unidas entre sí por, al menos, un puente de disulfuro [Stryer, 2003]. Las IgGs presentan así una masa de aproximadamente 150 kDa, con unas dimensiones aproximadas de $143 \times 77 \times 40 \text{ \AA}$ [Trilling, 2013]. Cada cadena presenta una región variable (V) situada en los extremos amino terminal (V_H , V_L) que exhibe una gran variabilidad en la secuencia de aminoácidos. Por el contrario las secuencias de aminoácidos situadas en los extremos carboxilo son prácticamente idénticas, por lo que se denominan región constante (C) para cada una de las cadenas (C_H , C_L). Las secuencias variables de aminoácidos en los extremos amino son las que confieren la especificidad antigénica a los diferentes anticuerpos. Cada inmunoglobulina presenta dos regiones idénticas de unión al antígeno.

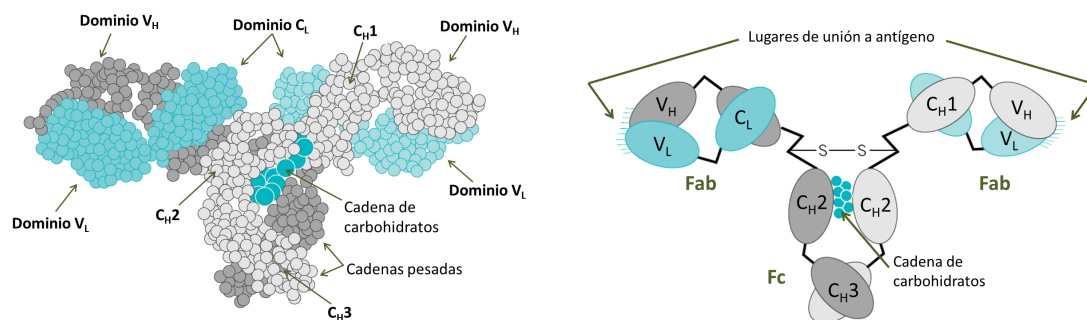


Figura 2.7. Estructura tridimensional de una IgG (izquierda) mostrando su clásica forma en Y, cada esfera representa un aminoácido; las esferas grandes correspondientes a la cadena de carbohidratos representan unidades individuales de hexosa. Se representa también una figura esquemática (derecha) en la que se indican los diferentes dominios de la inmunoglobulina [Silvertown, 1977; Elgert, 1998].

La región bisagra de la inmunoglobulina, que es la que une el fragmento Fc con los fragmentos Fab, confiere al anticuerpo una gran flexibilidad, permitiendo el movimiento independiente de cada región Fab, lo que permite un mejor reconocimiento del antígeno y posibilita la interacción con proteínas que enlazan anticuerpos [Janeway, 2001].

Aunque especies con un peso molecular inferior a los 8–10 kDa no son capaces de producir una respuesta inmune detectable, se pueden generar anticuerpos mediante el acoplamiento covalente de éstas pequeñas moléculas, denominadas haptenos, a proteínas portadoras [Clementi, 1991]. La tecnología actual permite por tanto la generación de anticuerpos *à la carte* frente a los diferentes analitos a determinar. Los anticuerpos presentan una elevada especificidad por su antígeno, lo que permite un reconocimiento selectivo del mismo incluso en presencia de un elevado número de otras sustancias, lo que hace que estos reactivos constituyan herramientas interesantes en el desarrollo de sistemas analíticos para la biosensorización de diversos analitos.

2.3.2 Generalidades sobre inmunoensayos

Los primeros inmunoensayos descritos fueron los radioinmunoensayos (RIA), desarrollados en los años 50 del siglo XX por Yalow y Berson, en los que se empleaba el radioisótopo ^{131}I para la detección de proteínas [Harris, 2007]. Sin embargo su utilidad era limitada debido a diversas deficiencias, como el elevado coste de la instrumentación empleada, la corta vida media de los radioisótopos y las posibles alteraciones del funcionamiento biológico inherentes a los materiales radiactivos [Voort, 2005]. Los inmunoensayos enzimáticos fueron introducidos por primera vez en 1971, por los investigadores Engvall, Perlmann, van Weemen y Schuurs [Lequin, 2005], lo que permitió el empleo de anticuerpos en ensayos para la determinación de analitos de una manera más útil y asequible al no ser necesarios procedimientos de seguridad para evitar contaminación radiológica, pero manteniendo la elevada sensibilidad alcanzada en la determinación analítica.

Los inmunoensayos se basan en la interacción entre un anticuerpo (**Ab**) y su antígeno (**Ag**), que tiene lugar mediante la formación de enlaces múltiples no covalentes entre el epítipo, la región de un antígeno que es reconocida por el anticuerpo, y el parátipo, el sitio de unión con Ag localizado en el anticuerpo. Esta interacción presenta una elevada afinidad y un alto grado de

reconocimiento. La interacción Ag–Ab es reversible y está controlada por la ley de acción de masas de acuerdo con:



donde, [Ab–Ag] es la concentración del complejo anticuerpo-antígeno o complejo inmunológico, [Ab] y [Ag] son las concentraciones libres de Ab y Ag, respectivamente, estando regido todo el proceso por la constante de afinidad K [Märtlbauer, 1994; Escamilla, 2009].

Clasificación

Los inmunoensayos más sencillos son aquellos que emplean los inmunorreactivos Ag y Ab sin modificaciones, estando basados en ensayos de aglutinación, inmunodifusión, inmuno-electroforesis o inmunturbidimetría [Abad, 2004]. Estos ensayos, sin embargo, sólo permiten el análisis cualitativo o semicuantitativo.

Las mejores características analíticas en términos de reproducibilidad y sensibilidad se obtienen empleando inmunorreactivos marcados con diversas especies capaces de proporcionar una señal analítica medible, como radioisótopos, enzimas o moléculas luminiscentes, entre otras. Dentro de este tipo de inmunoensayos, el formato **competitivo** y el tipo **sándwich** son los empleados más habitualmente con fines analíticos. En la **Figura 2.8** se representan los esquemas básicos de estos inmunoensayos.

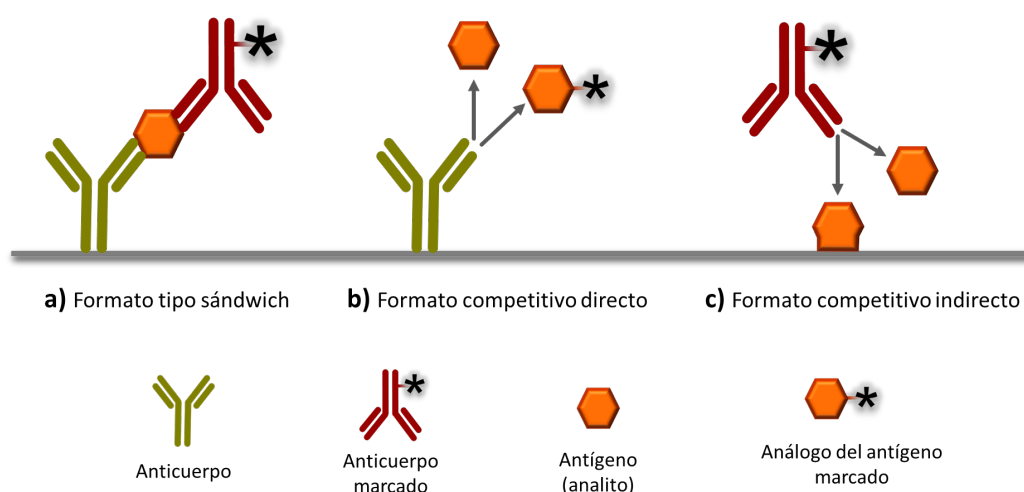


Figura 2.8. Representación esquemática de los principales formatos empleados en inmunoensayos basados en el uso de inmunorreactivos marcados. **a)** Formato tipo sándwich, en el que un anticuerpo primario o de captura permite la inmovilización del antígeno para su posterior reconocimiento con un anticuerpo secundario o de detección. La señal obtenida es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra. **b)** Formato competitivo directo, el antígeno compete con un análogo marcado por los sitios de unión de un anticuerpo inmovilizado. **c)** Formato competitivo indirecto, el antígeno y el antígeno inmovilizado compiten por los sitios de unión de un anticuerpo marcado. En los dos últimos casos la señal obtenida es inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra.

Mientras que el ensayo tipo sándwich requiere que el analito posea al menos dos epítopos o determinantes antigénicos distintos para su inmovilización por el anticuerpo de captura y marcaje con el anticuerpo de detección, para la detección de analitos de bajo peso molecular, que poseen sólo un determinante antigénico, sólo es posible el uso de ensayos basados en un formato competitivo.

Ventajas ofrecidas

Los inmunoensayos presentan una elevada especificidad en la interacción Ab-Ag, permitiendo alcanzar bajos límites de detección, lo que los hace una interesante alternativa frente a métodos convencionales para la determinación de analitos basados en técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas [Ronkainen, 2010]. La selectividad de los elementos de reconocimiento biológico empleados ofrece la posibilidad de desarrollar dispositivos altamente selectivos para el análisis de muestras complejas, sin necesidad de llevar a cabo exhaustivos tratamientos de las mismas. Se pueden analizar analitos de elevado peso molecular, como proteínas o bacterias y especies de bajo peso molecular, como hormonas o fármacos. Además, la selectividad puede ser controlada durante la generación de anticuerpos con la finalidad de obtener ensayos específicos frente a un determinado analito o frente a una familia de analitos.

En el caso de analitos de bajo peso molecular que no son capaces de generar una respuesta inmune por sí mismos, el diseño del hapteno y su acoplamiento a la proteína portadora para la producción de anticuerpos permite determinar el grado de reconocimiento del analito o familia de analitos. Muchas veces es preferible la obtención de un anticuerpo genérico que permita el reconocimiento de un grupo de analitos pertenecientes a una misma familia, en vez de un único analito en particular [Zhang, 2011; Wang, 2013]. Así, un hapteno genérico que contenga los principales grupos funcionales y estructurales de una familia de analitos permitirá la obtención de anticuerpos con una amplia reactividad cruzada frente a estas especies, posibilitando la determinación de todos los componentes de esa familia [Song, 2010].

2.3.3 Inmunosensores

Los inmunosensores incorporan un inmunoensayo en un sistema sensor para la detección de analitos en una muestra, basándose en el acoplamiento de la reacción inmunoquímica a la superficie de un transductor [Voort, 2005]. Estos biosensores inmunológicos son dispositivos analíticos compactos que permiten detectar la formación de complejos antígeno–anticuerpo de una forma más simple y rápida que los inmunoensayos [Ronkainen, 2010], convirtiendo estos eventos de reconocimiento en una señal analítica medible gracias a un transductor. Debido a la elevada estabilidad de la interacción antígeno–anticuerpo, y ya que generalmente el elemento de reconocimiento biológico está inmovilizado sobre la superficie transductora, la mayoría de los inmunosensores son de un solo uso, aunque pueden ser regenerados mediante tratamiento con disoluciones de pH y fuerza iónica adecuada.

Los inmunosensores combinan la elevada especificidad en el reconocimiento del analito debida a la reacción inmunológica con la elevada sensibilidad proporcionada por las técnicas de detección empleadas, lo que ha permitido el desarrollo de estos sistemas como claras alternativas a las técnicas de inmunoensayo convencionales [Escamilla, 2009], presentando límites de detección extremadamente bajos.

Dependiendo del método de transducción de la señal, los inmunosensores se pueden clasificar en electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos y termométricos, siendo las tres primeras estrategias analíticas, las utilizadas más comúnmente [Moina, 2012].

Inmunosensores electroquímicos

La formación de los inmunocomplejos Ab-Ag permite la generación de una señal eléctrica medible a través de diferentes métodos de transducción electroquímica, entre las que destacan las técnicas amperométricas (en las que se mide una intensidad de corriente), potenciométricas (en las que se miden diferencias de potencial) y conductimétricas (en las que se mide la resistencia o la conductividad). Dentro de los inmunosensores electroquímicos, los sistemas basados en detección amperométrica son los que han demostrado ser más adecuados debido a su elevada sensibilidad y a la simplicidad de los dispositivos empleados, lo que implica un bajo coste y posibilita la miniaturización del sistema analítico **[Ricci, 2007]**.

Inmunosensores piezoeléctricos

Este tipo de inmunosensores implica la medida del cambio de masa producido tras la formación del inmunocomplejo Ab-Ag mediante un dispositivo piezoeléctrico, como una microbalanza de cristal de cuarzo **[Moina, 2012]**. Este sistema se basa en el uso de un oscilador altamente estable y preciso, como es el cristal de cuarzo, sobre el que se inmoviliza uno de los inmunorreactivos y se realiza la reacción inmunológica. El cambio de masa debido a las moléculas inmovilizadas sobre el cristal afecta su frecuencia de resonancia permitiendo su detección **[Sauerbrey, 1959]**.

Inmunosensores ópticos

Estos inmunosensores están basados en la generación de una señal óptica que permite identificar la formación del complejo Ab-Ag mediante métodos de absorción, fluorescencia, fosforescencia o quimioluminiscencia. Constituyen el tipo de inmunosensores más ampliamente reportados **[Ricci, 2007]**, entre los que la técnica empleada más comúnmente es la resonancia de plasmón superficial (SPR), basada en la detección de los cambios superficiales que ocurren en una interfase a través de la monitorización de las condiciones necesarias para la excitación de los plasmones superficiales.

2.4 Inmovilización de elementos de reconocimiento biológico

En el diseño y desarrollo de biosensores, un proceso necesario y a la vez crítico durante su fabricación es la inmovilización de la especie de reconocimiento biológico sobre la superficie transductora. El procedimiento empleado para la inmovilización de estas biomoléculas condiciona en gran medida diversos aspectos relativos al funcionamiento del biosensor, como son su reproducibilidad, sensibilidad, selectividad y estabilidad, debido a que distintos métodos de inmovilización pueden afectar de forma diferente la estructura y actividad biológica de los elementos inmovilizados. Para un óptimo desempeño del biosensor fabricado, los elementos de biorreconocimiento deben retener su actividad biológica después de su inmovilización, siendo éste por tanto un factor crucial a tener en cuenta en el diseño y desarrollo de biosensores eficientes con un funcionamiento adecuado para la aplicación deseada.

2.4.1 Inmovilización sobre la superficie transductora

Para la inmovilización de distintas especies biorreceptoras se han ideado diferentes métodos, presentando distintas ventajas y limitaciones debidas a la naturaleza del proceso. En el caso de la inmovilización de proteínas, el grupo más usado de receptores biológicos, las principales características de las estrategias utilizadas más comúnmente en la construcción de biosensores se resumen en la **Tabla 2.4**.

Tabla 2.4. Ventajas y limitaciones de los principales métodos de inmovilización de proteínas [Sassolas, 2012].

	Naturaleza del enlace	Ventajas	Desventajas
Adsorción	Enlaces débiles	<ul style="list-style-type: none"> • Simple y fácil • Pérdida limitada de actividad 	<ul style="list-style-type: none"> • Desorción • Adsorciones inespecíficas
Enlace covalente	Enlace químico entre los grupos funcionales de la proteína y los del sustrato	<ul style="list-style-type: none"> • Sin barrera de difusión • Estable • Corto tiempo de respuesta 	<ul style="list-style-type: none"> • Matriz no regenerable
Atrapamiento	Incorporación de la proteína en un gel o polímero	<ul style="list-style-type: none"> • No hay reacción química entre el monómero y la proteína que puedan afectar su actividad • Diversos tipos de proteínas pueden ser inmovilizadas en el mismo polímero 	<ul style="list-style-type: none"> • Barrera de difusión • Pérdida de proteínas • Elevadas concentraciones de monómero y proteína para electropolimerización • Elevada pérdida de actividad
Entrecruzamiento	Enlace proteína/agente entrecruzante (p. ej. glutaraldehído)	<ul style="list-style-type: none"> • Simple 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada pérdida de actividad
Afinidad	Enlaces de afinidad entre grupo funcional y residuo afín en una secuencia proteica	<ul style="list-style-type: none"> • Inmovilización controlada y orientada 	<ul style="list-style-type: none"> • Necesita la presencia de grupos específicos en la proteína (p. ej. histidina, biotina)

Entre los protocolos anteriormente comentados, los procesos que implican una inmovilización no covalente, generalmente presentan un peor desempeño analítico debido a la reducida estabilidad operacional y de almacenamiento de los sensores.

Inmovilización covalente

La inmovilización covalente de proteínas sobre la superficie transductora es la que presenta ventajas más atractivas, ya que además de permitir una inmovilización bastante estable de la molécula biorreceptora, la pérdida de actividad de estas biomoléculas es baja.

La inmovilización covalente de proteínas generalmente se aprovecha de los abundantes grupos amino ($-NH_2$) presentes en las mismas. Estos grupos existen tanto en los extremos amino de las cadenas polipeptídicas que componen la proteína, como en los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina, aminoácidos abundantes en la mayoría de las proteínas [Hernandez, 2011]. En condiciones neutras, los grupos ϵ -amino se encuentran cargados positivamente, por lo que generalmente se disponen en la superficie exterior de las proteínas, estando accesibles para su anclaje a la superficie electródica sin que la estructura proteica sufra desnaturalización.

Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de este tipo de anclaje de las biomoléculas receptoras a las superficies transductoras, así como de la mayoría de los protocolos descritos en la **Tabla 2.4** es la inmovilización no orientada de dichas especies.

Inmovilización orientada

El proceso de inmovilización de los receptores biológicos condiciona la orientación de las especies inmovilizadas, pudiendo bloquear los centros activos de la biomolécula, y causando así un bajo reconocimiento de las moléculas diana, además de una pérdida severa de su actividad, al distorsionar zonas críticas de la proteína implicadas en el reconocimiento o funcionamiento activo de la biomolécula (por ejemplo, de una enzima). Por tanto, un aspecto importante a tener en cuenta en la fabricación de biosensores, es la inmovilización orientada de los elementos de biorreconocimiento, ya que determinará el funcionamiento del biosensor y permitirá obtener una mayor sensibilidad al estar éstos dispuestos en una orientación favorable para el reconocimiento e interacción con las moléculas a determinar.

Al emplear anticuerpos como elementos de biorreconocimiento, el control de la orientación en la inmovilización de los mismos sobre la superficie transductora proporciona un mejor reconocimiento del analito. Debido a que estas moléculas son asimétricas, los sitios de reconocimiento pueden tomar diferentes disposiciones espaciales, por lo que para obtener la mayor afinidad, las regiones de enlace antigénico deben permanecer libres después de su inmovilización. Las diferentes estrategias empleadas para el anclaje de las inmunoglobulinas a la superficie sensora puede resultar en una orientación específica o aleatoria de las mismas, que dependerá de diferentes grupos reactivos en la superficie modificada, en los anticuerpos o en ambos, que condicionen la capacidad de autoorganización de las inmunoglobulinas durante el proceso de inmovilización [Trilling, 2013]. El uso de proteínas bacterianas que interaccionan selectivamente y con diferente afinidad (ver **Tabla 2.5**) con determinadas regiones de las inmunoglobulinas permite la inmovilización reproducible y orientada de los anticuerpos, dejando libres los sitios de unión antigénica y minimizando el impedimento estérico en la reacción de reconocimiento [Björck, 1984; Valat, 2000; Vijayendran, 2001; Fowler, 2007; Tajima, 2011; Song, 2012^b]. Se emplean para este fin diferentes proteínas bacterianas, como la proteína L que interacciona selectivamente con las cadenas ligeras tipo κ de las

inmunoglobulinas [Interchim, 2007] o las proteínas A y G, que han sido las más ampliamente utilizadas [Trilling, 2013]. La proteína A es expresada en *Staphylococcus aureus* y presenta cinco sitios de unión a la región Fc de las IgG [Makaraviciure, 2013], mientras que la proteína G es una proteína celular superficial expresada en los grupos C y G de *Streptococci*, presentando tres dominios de unión a Fc, localizados cerca de su extremo C-terminal [Björck, 1984]. La proteína G presenta una mayor afinidad a IgG, además de una especificidad más amplia que la proteína A, permitiendo una interacción más universal frente a inmunoglobulinas de diversos orígenes [Song, 2012^b].

Tabla 2.5. Afinidad de enlace de las proteínas bacterianas L, A y G por las diferentes especies de inmunoglobulinas y sus subclases [Honegger, 2005; Interchim, 2007; Life Tech. Corp., 2013^a].

Especie	Inmunoglobulina y subclase	Proteína L	Proteína A	Proteína G
Humano	IgG1, IgG2, IgG4	++++	++++	++++
	IgG3	+++	–	+++
Ratón	IgG1	++++	+	+++
	IgG2a, IgG2b, IgG3	++++	+++	+++
Rata	IgG1	++++	–	+
	IgG2a	+++	–	++++
	IgG2b	+++	–	++
	IgG2c	++++	+	++
Cabra	IgG1	–	+	+++
	IgG2	–	+++	+++
Oveja	IgG1	–	+	++
	IgG2	–	+++	+++
Vaca	IgG1	–	+	+++
	IgG2	–	+++	+++
Caballo	IgG total	–	++	++++
Conejo	IgG total	+	+++	+++
Perro	Ig total	–	++	+
Gato	IgG total	–	+++	+
Cerdo	Ig total	+++	+++	++
Conejillo de indias	Ig total	++	++++	++
Pollo	IgY	–	–	–

++++, afinidad muy elevada; +++, afinidad elevada; ++, afinidad media; + afinidad débil; –, sin afinidad.

La inmovilización orientada de proteínas sobre la superficie sensora es importante tanto en la inmovilización de anticuerpos, como en la inmovilización de estas proteínas bacterianas empleadas para el enlace orientado de las inmunoglobulinas. Sin embargo, la sensibilidad del sistema sensor desarrollado dependerá en mayor medida de la orientación de los anticuerpos, puesto que tras una inmovilización no orientada de la proteína de unión selectiva, algunos sitios

de enlace pueden quedar bloqueados para unir anticuerpos, pero todos los anticuerpos que sean inmovilizados quedarán en una disposición correctamente orientada para el reconocimiento antigénico posterior [Makaraviciute, 2013].

Otro ejemplo de inmovilización orientada lo constituyen las proteínas con residuos específicos o *tags* en su estructura, que permiten la interacción adecuada con determinados grupos o receptores químicos sobre la superficie sensora. Así, el empleo de cadenas de poli-Histidinas (poliHis) para inmovilizar diversas proteínas sobre superficies modificadas con quelatos metálicos ha sido ampliamente usado. En estos casos, un soporte formado por complejos metálicos de diferentes elementos de transición (Ni(II), Co(II), Cu(II), Zn(II), Mn(II), Fe(III), entre otros), interacciona reversiblemente con grupos donadores de electrones en las proteínas, principalmente los residuos de His (aunque también pueden participar Cys y Trp) [Hernandez, 2011]. Este método de inmovilización está basado en la interacción reversible entre el ión del metal de transición y el *tag* de histidinas con el que se han clonado los receptores biológicos. Una de las principales ventajas de éste tipo de inmovilización es la reversibilidad de la misma, tras la adición de un ligando competitivo (generalmente imidazol o histidina) en exceso. La inmovilización de proteínas que incorporan residuos de histidina presenta la ventaja de preservar completamente la actividad de la proteína biorreceptora, al no ser necesaria ninguna modificación química de la misma para su inmovilización [Blankespoor, 2005]. Los avances en ingeniería genética para la producción de proteínas recombinantes han hecho que la incorporación de *tags* de poliHis a los extremos C-terminal o N-terminal de diversas proteínas pueda llevarse a cabo fácilmente mediante mutagénesis [Haddour, 2005; Vallina-García, 2007], permitiendo así la posterior purificación e inmovilización orientada de estos elementos de reconocimiento biológico.

2.4.2 Uso de partículas magnéticas

El uso de superficies microesféricas modificadas con grupos funcionales ha suscitado un considerable interés en los últimos años en los campos de diagnóstico y análisis debido a su elevada capacidad de enlace de diferentes especies como resultado del empleo de una fase sólida tridimensional con elevada relación superficie/volumen que mejora por tanto la sensibilidad en la detección [Lien, 2011]. Entre las diferentes microsuperficies tridimensionales modificadas, las partículas magnéticas, conocidas en inglés como *magnetic beads* (MBs) han demostrado ser sustratos excelentes para la captura selectiva de una amplia variedad de analitos. La utilización de estas partículas ha recibido un creciente interés porque son relativamente sencillas de sintetizar y modificar, además de ser fácilmente manipuladas gracias a su naturaleza magnética.

En los últimos años, numerosos tipos de partículas magnéticas de dimensiones micro y nanométricas, así como compósitos de estos materiales, han pasado a ser componentes clave en diferentes áreas, pudiendo encontrarse en catálisis, aplicaciones biomédicas, dispositivos sensores, separaciones inmunomagnéticas, imágenes de resonancia magnética y sistemas de liberación dirigida de fármacos, entre otras [Stanciu, 2009]. En el campo de los biosensores, las partículas magnéticas han sido utilizadas como plataformas de bioinmovilización, portadores magnéticos de biomoléculas, en la separación o concentración de analitos y para controlar procesos electroquímicos en superficies electródicas [Kuramitz, 2009]. De los diversos materiales magnéticos reportados en bibliografía, los óxidos de hierro, principalmente Fe₃O₄, han sido los más ampliamente usados debido a su simple preparación y propiedades superparamagnéticas [Pedrero, 2012]. Las partículas superparamagnéticas se magnetizan bajo

un campo magnético fuerte, no reteniendo magnetización residual en ausencia de éste, por lo que las partículas no interaccionan entre sí cuando son retiradas del campo magnético y pueden ser fácilmente resuspendidas en un medio líquido cualquiera, estando toda su superficie en contacto con el disolvente.

Las partículas de hierro pueden ser usadas para la simple adsorción de biomoléculas o ser encapsuladas en diversas matrices, usualmente compuestas de agarosa, celulosa, sílice, silano, vidrio poroso, mica o poliestireno [Paleček, 2007]. Esta modificación de los núcleos paramagnéticos de hierro permite aumentar la biocompatibilidad de los mismos y añadir diversas funcionalidades a la superficie de las partículas, logrando anclar diferentes elementos de reconocimiento biológico, lo que permite desarrollar diversos sensores catalíticos y de afinidad. Actualmente están disponibles comercialmente partículas magnéticas con diámetros comprendidos entre 0.5 y 10 μm , modificadas con una gran variedad de funcionalidades (estreptavidina, $-\text{COOH}$, proteínas bacterianas, entre otros) que permiten su conjugación con receptores convencionales (anticuerpos, oligonucleótidos, etc.) de manera sencilla y eficiente, presentando así una gran versatilidad y disponibilidad para diversas aplicaciones en diferentes reacciones de bioafinidad, como queda reflejado en la **Figura 2.9**.

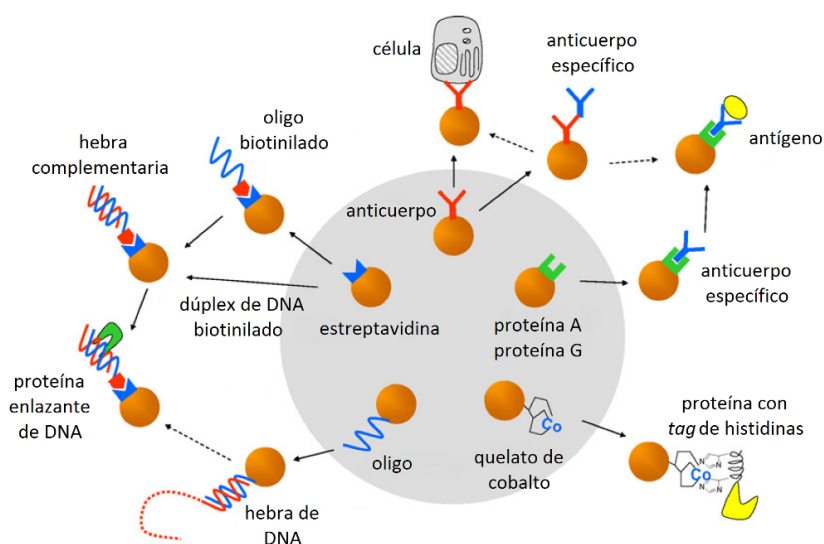


Figura 2.9. Versatilidad de las partículas magnéticas para ensayos de bioafinidad. Las partículas pueden estar modificadas con diferentes elementos de reconocimiento (sobre el fondo gris se muestran ejemplos de partículas magnéticas comercialmente disponibles) que pueden ser usados para la captura bioespecífica de diferentes moléculas. Adaptado de [Paleček, 2007] con autorización.

Además de su elevada relación superficie/volumen que permite una interacción eficiente con los analitos, las MBs pueden ser fácilmente separadas de la fase líquida al aplicar un pequeño campo magnético. Una vez que las partículas magnéticas son introducidas en la matriz de una muestra compleja, sólo los analitos diana serán selectivamente enlazados a la superficie de las partículas modificada con el biorreceptor adecuado. El complejo analito-MBs se puede separar entonces de la matriz, pudiendo resuspenderse inmediatamente después de retirar el campo magnético. Los métodos convencionales para el lavado de las partículas magnéticas incluyen la adición de una disolución reguladora al recipiente que las contiene, su puesta en disolución y su separación del líquido sobrenadante con ayuda de un imán. Este proceso de resuspensión y separación representa un ciclo de lavado de la fase sólida y si es

necesario, se puede repetir un determinado número de veces hasta alcanzar el grado deseado de limpieza, las especies que no son enlazadas específicamente son así removidas gracias a los lavados controlados magnéticamente, facilitando la eficiencia de los procesos de purificación y preconcentración **[Ramadan, 2011]**.

La mayor eficiencia de la reacción de reconocimiento, la minimización de las posibles interferencias de la matriz y las rápidas cinéticas de enlace que se consiguen empleando MBs como sustratos sólidos hacen que en la actualidad estén perfectamente integradas en el diseño de diversos sensores de afinidad. El uso de partículas magnéticas con esta finalidad proporciona numerosas ventajas adicionales, como el control y transporte del complejo analito-MBs a una localización específica cercana a la superficie transductora. Además, pueden ser retenidas o retiradas con un imán sin afectar dicha superficie, creando así posibilidades de regeneración y reutilización del sustrato electrodico **[Stanciu, 2009]**.

2.5 Revisión bibliográfica de métodos para la detección/determinación de residuos de antibióticos

El análisis de alimentos para identificar la presencia de diversos contaminantes químicos y biológicos es una práctica de crucial importancia para asegurar la calidad y seguridad alimentaria. Los animales dedicados a la producción de alimentos pueden estar expuestos intencional o accidentalmente a una amplia variedad de residuos químicos, por lo que es importante monitorizar diversas muestras de estos animales o sus productos derivados en busca de residuos que puedan presentar una amenaza a la salud pública. Es de particular importancia la monitorización de residuos de antibióticos en leche, con objeto de evitar las graves consecuencias que éstos pueden causar en la salud de los consumidores, así como las sustanciales pérdidas económicas que pueden ocasionar a la industria láctea. La leche es uno de los productos más severamente regulados en la industria alimentaria, por lo que existe la necesidad de un único método que pueda detectar numerosas clases de antibióticos simultáneamente a los niveles adecuados. Además, el amplio consumo de este producto hace necesaria la detección de residuos de antibióticos en la fase de producción **[Reder-Christ, 2011]**, antes de que se pueda producir una contaminación generalizada tras su entrada a la cadena alimenticia.

La monitorización de residuos de fármacos antimicrobianos depende en gran medida de la disponibilidad de técnicas analíticas adecuadas. A lo largo de la historia el análisis de residuos ha evolucionado permitiendo obtener límites de detección cada vez menores y una mejor resolución en las técnicas de separación, además del surgimiento de nuevas técnicas analíticas que permiten la identificación de residuos de una manera más rápida y simple. Actualmente diferentes técnicas bioanalíticas pueden ser usadas como métodos de cribado, con objeto de identificar la presencia o ausencia de residuos a los niveles establecidos por la legislación. Estas técnicas proporcionan una estimación semicuantitativa del contenido de residuos detectados de una manera simple y económica.

Sin duda las técnicas analíticas más utilizadas son las técnicas cromatográficas, particularmente las acopladas a espectrometría de masas, que permiten la identificación y cuantificación de diferentes residuos, incluso a muy bajas concentraciones. Ya que muy pocos productos farmacéuticos son volátiles y tienen que ser derivatizados antes de su análisis por cromatografía de gases, ésta técnica ha sido escasamente aplicada en este campo **[Sanvicens, 2011]**. Entre las técnicas cromatográficas, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es la más universalmente aplicada. Empleando esta técnica cromatográfica se han descrito diferentes metodologías, principalmente acopladas a espectrometría de masas **[Di Corcia, 2002; Baliz, 2003]**, detectores UV y electroquímicos **[Stolker, 2005; Kantiani, 2009]** e incluso técnicas de ultra alta eficacia **[Wang, 2009^b]** para la determinación de residuos de antibióticos. Se han descrito también métodos de electroforesis capilar, aunque debido a que es menos sensible que los métodos por HPLC, su aplicación al análisis de productos farmacéuticos resulta menos atractiva **[Sanvicens, 2011]**.

Los métodos cromatográficos presentan una alta especificidad y una excelente detectabilidad, sin embargo consumen mucho tiempo y son laboriosos cuando se debe analizar una gran cantidad de muestras. Requieren también equipos costosos, personal cualificado y complejas etapas de preparación de la muestra, así como grandes volúmenes de muestra y disolventes, además de presentar diversas dificultades en el análisis particular de distintas especies [Cháfer-Pericás, 2010^b]. Con objeto de superar estos inconvenientes y debido a la gran demanda de análisis y control alimentario, se han utilizado otras técnicas analíticas para la determinación de residuos de antibióticos en distintas matrices, siendo sólo usadas las técnicas cromatográficas para la confirmación de aquellas muestras que han resultado previamente sospechosas de estar contaminadas con los analitos a determinar [Adrian, 2008].

Una práctica habitual en la determinación de residuos farmacéuticos consiste en el empleo de métodos de cribado frente a uno o varios analitos en particular, analizando diversas muestras para determinar la ausencia o presencia de determinados residuos por encima de un cierto nivel, no importando en esta fase determinar la concentración ni la especie contaminante. Sólo aquellas muestras sospechosas de estar contaminadas serán posteriormente analizadas con un método confirmatorio más complejo que permita identificar y cuantificar las especies contaminantes [Traviesa-Alvarez, 2007; Davis, 2010; Raz, 2011]. Una ventaja significativa de los métodos de cribado es que la mayoría de ellos utilizan procedimientos de preparación de la muestra simples y rápidos, ya que están basados en el uso de elementos de reconocimiento selectivos. Los métodos de cribado deben satisfacer diversos requerimientos, como ser capaces de detectar los analitos de interés a los límites de detección requeridos por la legislación establecida, ser fáciles de realizar, presentar bajo coste y proporcionar resultados fiables y reproducibles [Petrović, 2008].

Como alternativa rápida a la determinación cromatográfica se han desarrollado diferentes ensayos y métodos de análisis que permiten la detección de residuos de antimicrobianos. Entre las alternativas más sencillas se encuentran las pruebas microbiológicas, ensayos cualitativos o semicuantitativos basados en la medida de la inhibición en el crecimiento de un microorganismo susceptible, generalmente una bacteria, como consecuencia de la presencia de residuos de antibióticos en las muestras analizadas. Para la detección de antibióticos en leche habitualmente se emplea como organismo sensor el microorganismo *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Este tipo de pruebas son frecuentemente empleadas en las lecherías como método de cribado [Strasser, 2003^a], sin embargo sus principales desventajas son su baja especificidad, insuficiente sensibilidad frente a diversos grupos de antibióticos y los largos períodos de tiempo necesarios para realizar la detección, requiriendo desde unas pocas horas hasta varios días, en función del analito y su concentración [Adrian, 2008].

Los ensayos basados en técnicas inmunoquímicas, enzimas y proteínas receptoras permiten determinaciones rápidas, generalmente son fáciles de manejar, presentan un elevado rendimiento en el análisis de muestras y tienen bajo coste. Además, los métodos basados en el uso de receptores selectivos permiten evitar etapas de tratamiento de la muestra, debido a la selectividad de estos receptores al interactuar con el analito a determinar, incluso en muestras complejas. Estas características han llevado a la aplicación de los métodos analíticos basados en diversos receptores biológicos en los laboratorios de control alimentario y monitorización medioambiental [Fernández, 2010], siendo ventajosos como métodos de cribado por lo que se han convertido en una alternativa interesante a otros métodos [Adrian, 2008].

Los inmunoensayos se caracterizan por su elevada especificidad, alta sensibilidad, simplicidad y rentabilidad, lo que los hace particularmente útiles para determinaciones rutinarias **[Cháfer-Pericás, 2010^b]**. Gracias a estas atractivas características se han reportado numerosos ensayos ELISA para el análisis de antibióticos, empleando tanto anticuerpos policlonales como monoclonales **[Kantiani, 2009]**. Los métodos basados en esta tecnología son ampliamente utilizados, sin embargo sigue siendo una técnica laboriosa y cara que requiere de un detector capaz de medir la intensidad de radiación, además de tediosos procesos de modificación y lavado de la placa en la que se realiza el ensayo y períodos de tiempo relativamente largos cuando se intentan analizar múltiples analitos y un elevado número de muestras **[Davis, 2010; Raz, 2011]**. Básicamente es una tecnología diseñada para su uso en laboratorio, no fácilmente aplicable a determinaciones *in situ* **[Park, 2004]**.

Actualmente existe la necesidad de métodos de alto rendimiento con una amplia capacidad de detección, así como de multidetección de antibióticos pertenecientes a diferentes familias de antimicrobianos **[Huet, 2010]**. La monitorización de acuerdo a la legislación establecida requiere de tecnología para la cuantificación precisa e *in situ* de residuos de antibióticos en diferentes productos alimentarios, sin necesidad de equipos complejos ni personal especializado **[Cháfer-Pericás, 2010^b]**.

El desarrollo de sistemas biosensores ha abierto una nueva y prometedora manera de emplear técnicas rápidas, sensibles y sencillas para la detección de contaminantes en el área medioambiental y agroalimentaria **[Reder-Christ, 2011]**. La importancia de los biosensores se basa en su elevada especificidad y sensibilidad que permite la detección de un amplio espectro de analitos en muestras complejas con un mínimo tratamiento de muestra, permitiendo la posibilidad de desarrollar dispositivos portátiles, rentables, fáciles de usar y potencialmente capaces de proporcionar una monitorización automatizada continua y multiplexada, todo ello con un alto rendimiento, corto tiempo de análisis y bajo consumo de reactivos **[Ricci, 2007; Cháfer-Pericás, 2010^b; Sanvicens, 2011]**. Los biosensores se basan en el uso de diversos receptores que interaccionan de manera selectiva con las especies a determinar, minimizando por tanto las etapas de tratamiento y preparación de la muestra con objeto de eliminar interferentes. Entre los diferentes receptores, los más comúnmente empleados son los anticuerpos, con los que se ha conseguido desarrollar inmunosensores con excelentes características y prestaciones. También se han desarrollado biosensores empleando otros receptores biológicos, como proteínas de reconocimiento selectivo y aptámeros de DNA y RNA.

Como alternativa a los receptores biológicos se ha propuesto el uso de polímeros de impronta molecular (MIPs), receptores artificiales que imitan las propiedades de reconocimiento de los materiales biológicos. La tecnología de impronta molecular se basa en la preparación de un material polimérico con capacidad de reconocimiento de un analito en particular, empleando monómeros funcionales que forman un complejo inicial con la molécula objetivo y tras su polimerización quedan retenidos en posiciones específicas debido a la estructura polimérica altamente entrecruzada. Tras remover la molécula empleada como plantilla, el material conserva sitios de unión que son complementarios en tamaño, forma y funcionalidad al analito **[Fernández-González, 2006; Suryanarayanan, 2010]**. Estos MIPs son muy estables y robustos y resisten la degradación en medios extremos, como medios ácidos y básicos, elevadas temperaturas y presiones, además son más baratos que sus análogos biológicos y pueden ser almacenados a temperatura ambiente por largos períodos de tiempo **[Suryanarayanan, 2010]**. Sin embargo, sólo pocos de ellos han encontrado aplicaciones en la determinación de antibióticos ya que su relativamente fácil degradación hace difícil su impronta mediante los

métodos clásicos de preparación de los MIPs, por lo que la mayoría de ellos no han podido sustituir a sus análogos biológicos y prácticamente sólo han encontrado aplicaciones en métodos de separación y preconcentración, como la extracción en fase sólida y HPLC.

Entre los diferentes biosensores desarrollados para la detección de antibióticos, los ópticos y particularmente aquellos basados en medidas por SPR han sido los más ampliamente descritos [Cháfer-Pericás, 2010^b]. La mayor ventaja potencial de este tipo de biosensores ópticos es la posibilidad de realizar medidas sin necesidad de marcadores y desarrollar sistemas de multidetección portátiles, sin embargo presentan diversas limitaciones. En el caso de sistemas que emplean detección fluorescente, aunque permiten obtener una buena sensibilidad, presentan varias desventajas como la fluorescencia de fondo, la baja intensidad de las señales, la presencia de adsorciones inespecíficas, o la rápida destrucción fotoquímica de los fluoróforos, lo que ha limitado su aplicación a la determinación de muestras reales [Ricci, 2007; Sanvicens, 2011]. La tecnología SPR, ha sido utilizada para la detección de antibióticos con excelentes prestaciones, permitiendo la detección rápida de estos analitos, existiendo muchos ejemplos de inmunosensores de SPR desarrollados con este fin. No obstante, la tecnología SPR requiere de instrumentación relativamente compleja y costosa, y son pocos los trabajos descritos que tratan aplicaciones prácticas empleando muestras de productos alimenticios.

Comparada con los ensayos espectrofotométricos, la aproximación electroquímica puede proporcionar menores tiempos de análisis con sensibilidades similares, requiriendo además menores volúmenes de muestra [Ricci, 2007]. Los métodos electroquímicos pueden usar electrodos serigrafiados desechables de un solo uso, lo que abarata la detección, mientras que los chips ópticos para SPR son más caros y requieren de etapas de regeneración para un uso múltiple del sensor que permita rentabilizar su coste [Davis, 2010]. Los biosensores electroquímicos, aunque generalmente requieren de un marcador que proporcione la señal analítica, ofrecen elevadas sensibilidades en comparación con los instrumentos de SPR y presentan como principales ventajas la miniaturización y capacidad de realizar determinaciones *in situ*.

A continuación se presenta una recopilación de los diferentes métodos descritos en bibliografía para la detección/determinación de residuos de antimicrobianos pertenecientes a las familias de antibióticos β -lactámicos, sulfonamidas y tetraciclinas en leche, así como los métodos desarrollados para la detección multiplexada de residuos de estos antibióticos.

2.5.1 Ensayos comerciales de análisis para la detección de residuos de antibióticos en leche

Existen varias pruebas disponibles comercialmente para la detección de residuos de antibióticos en leche. Poco después de la introducción de los fármacos antimicrobianos para el tratamiento de infecciones en medicina veterinaria, se desarrolló el primer ensayo para el análisis de residuos de antibióticos en leche, una prueba de inhibición microbiana. Este tipo de ensayos han demostrado ser adecuados para el cribado de muestras, sin embargo, su principal limitación son los largos períodos de incubación, requiriendo varias horas antes de que el resultado pueda ser obtenido [Sternesjö, 2006]. Para competir con la demanda de la industria láctea, han salido al mercado diferentes pruebas rápidas para la detección de residuos de antibióticos, las empleadas más comúnmente son pruebas microbiológicas, que implican la incubación de un organismo susceptible en presencia de la muestra de leche. En ausencia de antibióticos el organismo crece y puede ser detectado visualmente. En presencia de antibióticos

el crecimiento del organismo se ve inhibido y se obtiene una zona de inhibición o ausencia de cambio de coloración que permite su identificación. Estos métodos son muy simples y económicos, pero requieren varias horas para visualizar los resultados, siendo los más rápidos los que proporcionan resultados entre 2.5 y 4 h [Kantiani, 2009]. Además las cepas empleadas se deben controlar constantemente para asegurar que no han desarrollado resistencia a los antibióticos a determinar [Babington, 2012].

Debido a estos inconvenientes, los ensayos de inhibición microbiana tradicionales han sido reemplazados por pruebas rápidas basadas en el uso de proteínas receptoras genéricas y específicas. Sin embargo, a pesar de la rapidez de los análisis, con resultados normalmente entre 5-10 min, la aplicabilidad de estas pruebas es limitada debido a su insuficiente capacidad para el análisis y a la frecuente atención requerida de personal para su ejecución y valoración [Gustavsson, 2004], además de requerir algunos de ellos de un tratamiento térmico de la muestra durante unos minutos [Cháfer-Pericás, 2010^b] o de lectores especiales para proporcionar resultados cuantitativos [Babington, 2012].

Existen también ensayos basados en la tecnología SPR disponibles comercialmente, aunque para el cribado de muestras estos sistemas se consideran caros y presentan posibilidades limitadas para la multidetección [Raz, 2011].

En la **Tabla 2.6** se recogen las diferentes pruebas disponibles comercialmente para la detección de residuos de antimicrobianos pertenecientes a las familias de las tetraciclinas, sulfonamidas y β -lactamas en leche. Muchas de estas pruebas aseguran ser rápidas y permitir la detección de residuos de antibióticos en leche a los niveles requeridos por la legislación establecida. Sin embargo son poco fiables debido a que la interpretación de los resultados es subjetiva ya que se basan en cambios de coloración y pueden dar lugar a falsos positivos o negativos, además de ser susceptibles a la presencia de interferencias o requerir condiciones especiales para llevar a cabo la detección. Con objeto de obtener un sistema analítico rápido y fiable para la detección y determinación de residuos de antibióticos se han desarrollado diversas metodologías alternativas que se discuten en los apartados posteriores.

Tabla 2.6. Ensayos disponibles comercialmente para la detección de residuos de fármacos antimicrobianos pertenecientes a las familias de las tetraciclinas, sulfonamidas y β -lactamas en leche.

Prueba	Fabricante	Residuos detectados	Sensibilidad / ppb [NMPPF, 2013]	Tiempo de análisis	Observaciones	Fuente
BetaStar US Beta-lactam Test ^a	Neogen Corp.	Amoxicilina Ampicilina Cefapirina Cloxacilina Penicilina	6.0 5.9 19.5 9.1 4.8	5 – 8 min (incluyendo incubación a 47 °C durante 3 min)	—	www.neogen.com
Charm II Beta-lactam Test (Competitive) ^a	Charm Sciences, Inc.	Amoxicilina Ampicilina Cefapirina Ceftiofur Cloxacilina Penicilina	7.5 5.7 4.2 47 70 3.0	8 – 10 min	Requiere el sistema modular de lectura Charm II	www.charm.com
Charm II Beta-lactam Test (Quantitative) ^a	Charm Sciences	Amoxicilina Ampicilina Cefapirina Ceftiofur Cloxacilina Penicilina	8.1 6.6 4.1 8 8.5 3.4	8 – 10 min	Requiere el sistema modular de lectura Charm II	www.charm.com
Charm II Beta-lactam Test (Sequential) ^a	Charm Sciences	Amoxicilina Ampicilina Cefapirina Ceftiofur Cloxacilina Penicilina	8.1 6.6 4.1 58 50 3.4	8 – 10 min	Requiere el sistema modular de lectura Charm II	www.charm.com

Tabla 2.6. (Continuación).

Prueba	Fabricante	Residuos detectados	Sensibilidad / ppb [NMPF, 2013]	Tiempo de análisis	Observaciones	Fuente
Charm <i>B. stearothermophilus</i> Tablet Disc Assay ^a	Charm Sciences	Amoxicilina	7.5	2.5 – 3 h	Basado en inhibición microbiana	www.charm.com
		Ampicilina	6.7			
		Cefapirina	11.7			
		Ceftiofur	> 100			
		Clortetraciclina	1 000			
		Cloxacilina	48			
		Oxitetraciclina	1 000			
		Penicilina	3.8			
		Sulfadimetoxina	10 000			
Charm Cowside II Test	Charm Sciences	Tetraciclina	1 000	~3 h	Basado en inhibición microbiana	www.charm.com
		Amoxicilina	4.0			
		Ampicilina	4.0			
		Cefapirina	10			
		Ceftiofur	> 100			
		Clortetraciclina	100			
		Cloxacilina	25			
		Oxitetraciclina	100			
		Penicilina	3.0			
		Sulfaclopiridazina	50			
		Sulfadiazina	50			
		Sulfadimetoxina	25			
		Sulfamerazina	100			
		Sulfametazina	100			
		Sulfametoxazol	50			
		Sulfapiridina	100			
		Sulfatiazol	50			
		Tetraciclina	100			

Tabla 2.6. (Continuación).

Prueba	Fabricante	Residuos detectados	Sensibilidad / ppb [NMPF, 2013]	Tiempo de análisis	Observaciones	Fuente
Charm HPLC-Receptogram	Charm Sciences	Amoxicilina	10.0	—	Acoplamiento a separación cromatográfica	www.charm.com
		Ampicilina	2.0			
		Cefapirina	2			
		Ceftiofur	30 – 40			
		Clortetraciclina	15			
		Cloxacilina	10			
		Oxitetraciclina	15			
		Penicilina	5.0			
		Sulfacloropiridazina	10			
		Sulfadiazina	5			
		Sulfadimetoxina	5			
		Sulfamerazina	5			
		Sulfametazina	5			
		Sulfametoxazol	5			
		Sulfapiridina	5			
		Sulfatiazol	5			
		Tetraciclina	5			
Charm ROSA Sulfa Test	Charm Sciences	Sulfacloropiridazina	3	8 min	Portátil y de fácil uso	www.charm.com
		Sulfadiazina	2			
		Sulfadimetoxina	1			
		Sulfamerazina	3			
		Sulfametazina	6			
		Sulfametoxazol	2			
		Sulfapiridina	10			
		Sulfatiazol	1			
Charm ROSA Tetracycline Test	Charm Sciences	Clortetraciclina	250	8 min	Portátil y de fácil uso	www.charm.com
		Oxitetraciclina	250			
		Tetraciclina	90			

Tabla 2.6. (Continuación).

Prueba	Fabricante	Residuos detectados	Sensibilidad / ppb [NMPF, 2013]	Tiempo de análisis	Observaciones	Fuente
Charm SL Beta-lactam Test ^a	Charm Sciences	Amoxicilina	5.6	8 min	Portátil y de fácil uso	www.charm.com
		Ampicilina	8.5			
		Cefapirina	13.7			
		Ceftiofur	77			
		Cloxacilina	50			
		Penicilina	3.6			
Charm 3 SL3 Beta-lactam Test ^a	Charm Sciences	Amoxicilina	8.4	3 min	Portátil y de fácil uso	www.charm.com
		Ampicilina	8.0			
		Cefapirina	20.0			
		Ceftiofur	79			
		Cloxacilina	8.6			
		Penicilina	3.8			
Charm Flunixin and Beta-lactam Test ^a	Charm Sciences	Amoxicilina	5.9	8 min	Portátil y de fácil uso	www.charm.com
		Ampicilina	6.8			
		Cefapirina	13.4			
		Ceftiofur	63			
		Cloxacilina	75			
		Penicilina	2.0			
Charm SL6 Beta-lactam Test ^a	Charm Sciences	Amoxicilina	7.1	8 min	Portátil y de fácil uso	www.charm.com
		Ampicilina	9.6			
		Cefapirina	18.7			
		Ceftiofur	72			
		Cloxacilina	8.3			
		Penicilina	4.2			
Charm II Test for Cloxacillin in Milk (Competitive Assay) ^a	Charm Sciences	Cloxacilina	8.5	10 – 15 min	Requiere el sistema modular de lectura Charm II	www.charm.com

Tabla 2.6. (Continuación).

Prueba	Fabricante	Residuos detectados	Sensibilidad / ppb [NMPF, 2013]	Tiempo de análisis	Observaciones	Fuente
Charm II Sulfa Drug Test (Competitive Assay) ^a	Charm Sciences	Sulfacloropiridazina	5	10 min	Requiere el sistema modular de lectura Charm II	www.charm.com
		Sulfadiazina	4.9			
		Sulfadimetoxina	4.0			
		Sulfamerazina	4			
		Sulfametazina	9.4			
		Sulfametoxazol	20			
		Sulfapiridina	10			
		Sulfatiazol	7.3			
Charm II Tetracycline Test (Competitive Assay) ^a	Charm Sciences	Clortetraciclina	257	10 – 15 min	Requiere el sistema modular de lectura Charm II	www.charm.com
		Oxitetraciclina	119			
		Tetraciclina	67			
Delvotest BLF	DSM Food Specialties	Amoxicilina	3.0	5 min (incubación a 64 °C)	—	www.dsm.com
		Ampicilina	5.0			
		Cefapirina	4.0			
		Ceftiofur	< 20			
		Cloxacilina	17			
		Penicilina	3.0			
Delvotest P 5 Pack ^a	DSM Food Specialties	Amoxicilina	4.6	~2.5 h (incubación a 64 °C)	Basado en inhibición microbiana	www.dsm.com
		Ampicilina	4.0			
		Cefapirina	8.2			
		Ceftiofur	> 100			
		Clortetraciclina	250 – 300			
		Cloxacilina	30			
		Oxitetraciclina	400			
		Penicilina	2.1			
		Tetraciclina	300			

Tabla 2.6. (Continuación).

Prueba	Fabricante	Residuos detectados	Sensibilidad / ppb [NMPF, 2013]	Tiempo de análisis	Observaciones	Fuente
Delvotest P / Delvotest P Mini ^a	DSM Food Specialties	Amoxicilina	7.7	~2.5 h (incubación a 64 °C)	Basado en inhibición microbiana	www.dsm.com
		Ampicilina	5.1			
		Cefapirina	7.0			
		Ceftiofur	> 100			
		Clortetraciclina	250 – 300			
		Cloxacilina	25			
		Oxitetraciclina	300			
		Penicilina	3.1			
Delvotest SP / Delvotest SP Mini ^a	DSM Food Specialties	Tetraciclina	300	~3 h (incubación a 64 °C)	Basado en inhibición microbiana	www.dsm.com
		Amoxicilina	6.0			
		Ampicilina	7.9			
		Cefapirina	7.7			
		Ceftiofur	> 100			
		Clortetraciclina	250 – 300			
		Cloxacilina	20			
		Oxitetraciclina	400			
		Penicilina	2.7			
		Sulfadiazina	100			
		Sulfadimetoxina	100			
		Sulfametazina	100			
		Sulfapiridina	250			
		Sulfatiazol	100			
		Tetraciclina	400			

Tabla 2.6. (Continuación).

Prueba	Fabricante	Residuos detectados	Sensibilidad / ppb [NMPF, 2013]	Tiempo de análisis	Observaciones	Fuente
Delvotest SP-NT	DSM Food Specialties	Amoxicilina	3.0	2.5 – 3 h (incubación a 64 °C)	Basado en inhibición microbiana	www.dsm.com
		Ampicilina	2.0			
		Cefapirina	4 – 6			
		Ceftiofur	130			
		Clortetraciclina	200			
		Cloxacilina	11			
		Oxitetraciclina	235			
		Penicilina	1.5			
		Sulfadiazina	50			
		Sulfadimetoxina	100			
		Sulfamerazina	50 – 100			
		Sulfametazina	25 – 100			
		Sulfametoxazol	< 50			
		Sulfatiazol	50			
		Tetraciclina	270			
Delvotest T	DSM Food Specialties	Amoxicilina	4.0	~3 h (incubación a 64 °C)	Basado en inhibición microbiana	www.dsm.com
		Ampicilina	3.0			
		Cefapirina	5			
		Clortetraciclina	150			
		Cloxacilina	5			
		Oxitetraciclina	80			
		Penicilina	2.0			
		Sulfadiazina	50			
		Sulfadimetoxina	40			
		Sulfametazina	150			
		Sulfatiazol	50			
		Tetraciclina	75			

Tabla 2.6. (Continuación).

Prueba	Fabricante	Residuos detectados	Sensibilidad / ppb [NMPF, 2013]	Tiempo de análisis	Observaciones	Fuente
Eclipse® 3G	ZEU-Inmunotec	Amoxicilina	3.0	~2.5 h (incubación a 65 °C)	Basado en inhibición microbiana	www.zeulab.com
		Ampicilina	3.0			
		Cefapirina	8			
		Ceftiofur	60			
		Cloxacilina	30			
		Oxitetraciclina	50			
		Penicilina	2 – 3			
		Sulfadiazina	100			
		Sulfametazina	150			
		Sulfatiazol	50			
		Tetraciclina	100			
New SNAP Beta-lactam Test Kit (Visual)	IDEXX Labs, Inc.	Amoxicilina	6.9	10 min (incubación a 45 °C)	—	www.idexx.com
		Ampicilina	6.2			
		Cefapirina	11.9			
		Penicilina	3.1			
New SNAP Beta-lactam Test Kit (Reader) ^a	IDEXX Labs, Inc.	Amoxicilina	7.3	10 min (incubación a 45 °C)	Requiere módulo de lectura	www.idexx.com
		Ampicilina	5.8			
		Cefapirina	11.7			
		Ceftiofur	12			
		Cloxacilina	50			
		Penicilina	3.0			
Penzyme® Milk Test	Neogen Corp.	Amoxicilina	6.0	20 min (incubación a 45 °C)	—	www.neogen.com
		Ampicilina	7.0			
		Cefapirina	11.6			
		Penicilina	5.0			
SNAP Tetracycline Test	IDEXX Labs, Inc.	Clortetraciclina	100	10 min (incubación a 45 °C)	—	www.idexx.com
		Oxitetraciclina	50			
		Tetraciclina	50			

Tabla 2.6. (Continuación).

Prueba	Fabricante	Residuos detectados	Sensibilidad / ppb [NMPF, 2013]	Tiempo de análisis	Observaciones	Fuente
SNAP Sulfamethazine Test	IDEXX Labs, Inc.	Sulfametazina	10	10 min (incubación a 45 °C)	—	www.idexx.com
Trisensor	Unisensor S.A.	Amoxicilina	3 – 5	6 min	—	www.unisensor.be
		Ampicilina	3 – 5			
		Cefapirina	6 – 8			
		Ceftiofur	10 – 15			
		Clortetraciclina	50 – 55			
		Cloxacilina	6 – 8			
		Oxacilina	12 – 18			
		Oxitetraciclina	50 – 60			
		Penicilina	2 – 3			
		Sulfacloropiridazina	5 – 10			
		Sulfadiazina	5 – 6			
		Sulfamerazina	1.5 – 2.5			
		Sulfametazina	1 – 1.5			
		Sulfametoxazol	150 – 300			
		Sulfapiridina	0.5 – 1			
		Sulfatiazol	4 – 8			
		Tetraciclina	80 – 100			

^a Aprobados como métodos de cribado por la FDA [NMPF, 2013].

Abreviaturas: ppb, partes por billón.

2.5.2 Métodos descritos para la determinación de antibióticos β -lactámicos en leche

Se han descrito numerosos métodos cromatográficos para la determinación de antibióticos β -lactámicos, incluyendo un método cuantitativo y confirmatorio mediante LC-MS/MS [Holstege, 2002], así como un amplio número de métodos usando varias fases móviles y estacionarias para la determinación de cefalosporinas en leche [Oliveira, 2006]. Sin embargo, la determinación cromatográfica de residuos de antibióticos β -lactámicos presenta diversas dificultades debido a la labilidad del anillo β -lactámico, susceptible a la degradación especialmente por el calor y la presencia de alcoholes [Stolker, 2005] y a la fácil isomerización de las penicilinas en medio ácido, por lo que se deben tomar diversas precauciones en cuanto al pH y la temperatura en las etapas de preparación de la muestra especialmente a bajas concentraciones. La amoxicilina y la ampicilina son especialmente difíciles de analizar debido a su naturaleza anfotérica.

Entre los métodos ópticos para la detección de estos antimicrobianos se ha descrito la detección de diez antibióticos β -lactámicos mediante quimioluminiscencia, a través de su reacción con tris(bipiridina)rutenio(II). El antibiótico promueve cambios en la quimioluminiscencia al ser hidrolizado por β -lactamasas o NaOH. Aunque este método demostró su aplicabilidad a la determinación de estos antibióticos en muestras de leche, proporcionando un límite de detección (LD) de 25 μM para PENG, presenta la interferencia de todas aquellas moléculas con grupos amina que pueden promover la quimioluminiscencia del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ [Liang, 1996].

Mediante análisis por inyección en flujo fue posible la determinación de penicilinas en productos farmacéuticos y muestras de leche (tras desproteinización, centrifugación y filtración), empleando extracción en fase sólida para la preconcentración de los analitos y detección UV. Se obtuvo un intervalo cuantificable comprendido entre 41 y 1400 ng mL^{-1} , con LDs comprendidos entre 12 y 19 ng mL^{-1} [El-Shahat, 2010].

Se ha reportado también un sistema microfluídico de quimioluminiscencia combinado con extracción en fase sólida empleando una microcolumna con partículas de gel de sílice modificadas con C_{18} para la determinación de antibióticos β -lactámicos en leche tras su desproteinización. Este método, basado en el aumento de quimioluminiscencia del sistema $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -luminol inducido por los antibióticos β -lactámicos, permitió la cuantificación de cuatro β -lactamas en concentraciones comprendidas entre 0.04 y 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [Liu, 2007].

Hasta el momento se han reportado pocos ejemplos de biosensores aptaméricos para la determinación de antibióticos β -lactámicos. Empleando una secuencia específica de cadena sencilla de DNA (ssDNA) para la detección de ampicilina mediante detección por fluorescencia y colorimetría, se obtuvieron LDs de 2 ng mL^{-1} y 10 ng mL^{-1} , respectivamente. El método permitió la determinación de ampicilina entre 0.5 y 50 ng mL^{-1} en leche desproteinizada, tras dos horas de incubación [Song, 2012^a]. Se ha descrito también un sensor impedimétrico para la determinación de ampicilina empleando un aptámero selectivo, obteniéndose un intervalo lineal comprendido entre 100 pM y 1 μM , aplicable a la determinación de este antibiótico en muestras de leche tras su dilución [Daprà, 2013].

A través de la medida de la producción de CO₂ relacionada con el crecimiento microbiano de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, se desarrolló un biosensor híbrido basado en la inhibición del crecimiento bacteriano en presencia de β-lactamas. Mediante el análisis de la variación de CO₂ entre muestras de leche contaminadas con β-lactamas en ausencia y en presencia de una β-lactamasa de amplio espectro fue posible la determinación de seis penicilinas y dos cefalosporinas tras un tiempo de incubación 120 min [Ferrini, 2008].

Se han sintetizado diversos MIPs para el reconocimiento de antibióticos β-lactámicos, entre ellos se ha descrito un MIP selectivo para tres antibióticos de esta familia (penicilina G, penicilina V y oxacilina) [Skudar, 1999], ampicilina [Lübke, 2000] y PENG [Cederfur, 2003]. Empleando ciclodextrinas como monómeros funcionales se sintetizaron también MIPs para feneticilina y cefazolina [Asanuma, 2001]. La aplicación práctica para la determinación de antibióticos β-lactámicos se ha realizado enlazando un MIP a gel de sílice para la extracción en fase sólida de estos analitos en una columna cromatográfica, analizando posteriormente el eluato por voltamperometría de redisolución adsorbtiva [Prasad, 2003]. Empleando un MIP magnético que incorpora Fe₃O₄ se realizó la determinación de antibióticos β-lactámicos en leche mediante LC-MS [Zhang, 2010]. Se ha descrito también un MIP sol-gel para la detección de nafcilina por fosforescencia en un sistema de análisis por inyección en flujo, obteniéndose un intervalo cuantificable comprendido entre 3.3×10^{-5} y 6.0×10^{-4} M, con un LD de 5.8 μM. Se llevó a cabo la detección en leche tras su desproteínización, sin embargo, el método presentó interferencia por parte de la OTC [Guardia, 2006].

Como se observa en la **Tabla 2.7**, se han desarrollado diferentes inmunoensayos para la detección de antibióticos β-lactámicos en leche. La obtención de anticuerpos contra antibióticos β-lactámicos intactos ha sido difícil, debido a que el proceso de inmunización frecuentemente origina la forma abierta del anillo β-lactámico y consecuentemente da lugar a anticuerpos frente a penicilinas hidrolizadas [Benito-Peña, 2005], por lo que los anticuerpos empleados presentan generalmente una mayor afinidad por la forma abierta del anillo β-lactámico.

Sin embargo, puesto que los LMRs están establecidos para especies intactas y no para sus metabolitos o productos de degradación [Lamar, 2007], los anticuerpos usados para métodos inmunoquímicos deben ser específicos para el anillo β-lactámico no hidrolizado.

En 2006 se presentó un inmunoensayo enzimático comercial para penicilinas que aseguraba ser específico para los compuestos intactos [Lamar, 2007]. Sin embargo, podía detectar penicilinas pero no cefalosporinas. Aunque se han descrito anticuerpos policlonales genéricos que reconocen β-lactamas intactas (como PENG o AMP) y presentan una baja reactividad cruzada frente a las formas hidrolizadas [FitzGerald, 2007], los inmunoensayos desarrollados carecen de la sensibilidad y selectividad requeridas, y muchos han sido desarrollados sólo como prueba de concepto pero no se han aplicado al análisis de muestras [Babington, 2012].

Una alternativa prometedora consiste en el uso de proteínas receptoras, como las PBPs que hacen posible la discriminación entre las formas activas e hidrolizadas de los antibióticos β-lactámicos, debido a que interaccionan exclusivamente con β-lactamas intactas y presentan elevadas afinidades tanto para penicilinas como para cefalosporinas [Lamar, 2007; Kantiani, 2009]. En la **Tabla 2.8** se resumen las principales características analíticas de los ensayos de afinidad reportados basados en el uso de proteínas receptoras.

Se han descrito también diversos métodos basados en técnicas electroquímicas para la determinación de antibióticos β -lactámicos. Los antibióticos β -lactámicos son susceptibles de presentar una oxidación del grupo sulfuro a sulfóxido en el anillo β -lactámico [Švorc, 2012] y en función de los sustituyentes pueden presentar también otras respuestas electroquímicas, como es el caso de la amoxicilina que presenta un grupo sustituyente fenólico. La oxidación de las penicilinas usualmente ocurre en ondas no claramente definidas a potenciales positivos muy elevados, pudiendo ser afectados por diversas reacciones electroquímicas y limitando la ventana de potencial anódico. En la **Tabla 2.9** se comparan las características analíticas más relevantes de los métodos basados en técnicas electroquímicas para la determinación de antibióticos β -lactámicos en leche.

Tabla 2.7. Comparación de las características analíticas de los diferentes inmunoensayos descritos para la determinación de antibióticos β -lactámicos en leche.

Protocolo del inmunoensayo	Tipo de detección	IC ₅₀ ^a	ID ^a	LD ^a	Tratamiento de muestra	Tiempo de ensayo	Referencia
Inmunoensayo competitivo por FI automatizado con anticuerpos inmovilizados sobre inmunorreactor modificado con ProtG	Amperométrica (150 mV vs. Ag/AgCl)	—	—	1 (CFX)	Tratamiento térmico para inactivar AP	16 min	[Meyer, 1999]
Inmunoensayo competitivo indirecto con Ab frente a forma abierta del anillo β -lactámico, tras hidrólisis: a) enzimática (con penicilinasas) b) mediante tratamiento químico (hidrólisis básica)	SPR	a) 71.6 (AMP) b) 92 (AMP)	—	a) 33 (AMP) b) 12.5 (AMP)	Centrifugación	Hidrólisis muestras: a) 60 min b) 50 min	[Gaudin, 2001]
ELISA competitivo indirecto con Ab frente a la forma hidrolizada (hidrólisis de antibióticos con penicilinasas antes de la medida)	Espectrofotométrica	0.2 (PENG) 0.65 (CLOX)	—	0.02 (PENG) 0.02 (CLOX)	—	~2 h (+preparación placa: 30 min)	[Grubelnik, 2001]
Inmunoensayo competitivo directo por FI con detección amperométrica, empleando análogo de antibiótico marcado con AP	Amperométrica (150 mV vs. Ag/AgCl)	—	3 – 30 (CFL)	1 (CFL)	Centrifugación y tratamiento térmico para inactivar AP	16 min	[Zhi, 2001]
Inmunoensayo competitivo indirecto. Inmovilización del análogo de antibiótico sobre la superficie del chip modificada con dextrano.	SPR	—	CFX: 4.88 – 2500 (PBS) 0.24 – 3.91 (Leche)	—	—	~15 min	[Dillon, 2003]
ELISA competitivo directo	Espectrofotométrica	2 (PENG)	—	1 (PENG) 3 (NFC) 2 (OXA) 2 (AMP) 4 (AMOX) 4 (CLOX) 6 (DCLOX)	Centrifugación	2 h 20 min (+preparación placa: o/n)	[Strasser, 2003 ^b]

Tabla 2.7. (Continuación).

Protocolo del inmunoensayo	Tipo de detección	IC ₅₀ ^a	ID ^a	LD ^a	Tratamiento de muestra	Tiempo de ensayo	Referencia
ELISA competitivo indirecto	Espectrofotométrica	—	10 – 1000 (AMP)	5.0 (AMP)	Centrifugación y dilución	2.5 h (+preparación placa: o/n)	[Samsonova, 2005]
ELISA competitivo directo (kit comercial: <i>Randox Labs.</i>)	Espectrofotométrica	—	—	Entre 1.0 y 6.8 (11 antibióticos)	—	1 h 20 min	[FitzGerald, 2007]
Inmunosensor impedimétrico sin marcador, medida por inyección en flujo. antiPENG inmovilizado sobre AuE modificado con monocapa autoensamblada de ácido tióctico	EIS	—	1.0×10 ⁻¹³ – 1.0×10 ⁻⁸ M (PENG)	3.0×10 ⁻¹⁵ M (PENG)	—	~15 min	[Thavarungkul, 2007]
FIA competitivo indirecto	Fluorimétrica	220 (AMP)	—	1 (AMP)	—	1 h 10 min (+preparación placa: o/n + bloqueo 4 h)	[Bacigalupo, 2008]
Inmunoensayo con anticuerpos modificados con AuNPs	Medida de la dispersión de resonancia	—	7.5 – 1700 (PENG)	0.78 (PENG)	Extracción con acetonitrilo y concentración por evaporación	20 min	[Jiang, 2008]
ELISA competitivo directo para la determinación de ácido bencilpeniciloico	Espectrofotométrica	0.32	—	0.030	Centrifugación y dilución	1.5 h (+preparación placa: o/n + bloqueo: 1 h)	[Zhang, 2010 ^b]
ELISA competitivo directo con pAb	Espectrofotométrica	0.8 (PENG)	—	0.2 (PENG)	Centrifugación	—	[Kress, 2011]
ELISA competitivo indirecto con pAb y análogo de antibiótico conjugado con GOD	Espectrofotométrica	7.8 (CFQ)	4 – 40 (CFQ)	1.5 (CFQ)	Centrifugación	—	[Thal, 2011]
ELISA competitivo indirecto para la determinación de cefalosporinas con mAb	Espectrofotométrica	0.7 (CTF)	0.3 – 2 (CTF)	0.30 (CTF) ^b	Centrifugación	2 h 20 min (+preparación placa: o/n)	[Bremus, 2012]
		1.1 (CFQ)	0.4 – 8 (CFQ)	0.40 (CFQ) ^b			
		5.2 (CFL)	2.7 – 38 (CFL)	2.70 (CFL) ^b			
		21.0 (CPZ)	10.6 – 105 (CPZ)	10.6 (CPZ) ^b			
		40.3 (CEF)	17.2 – 250 (CEF)	17.2 (CEF) ^b			

Tabla 2.7. (Continuación).

Protocolo del inmunoensayo	Tipo de detección	IC ₅₀ ^a	ID ^a	LD ^a	Tratamiento de muestra	Tiempo de ensayo	Referencia
ELISA competitivo indirecto con mAb genérico	Espectrofotométrica	5.8 (AMOX)	—	0.9 (AMOX)	Extracción con acetonitrilo	1 h 45 min (+preparación placa: o/n)	[Jiao, 2013]
		5.0 (AMP)		0.7 (AMP)			
		6.4 (PENG)		1.2 (PENG)			
		6.7 (PENV)		2.0 (PENV)			
		8.7 (CBC)		3.7 (CBC)			
		9.2 (SBC)		4.3 (SBC)			
		10.2 (MTI)		4.5 (MTI)			
		18.7 (CLOX)		6.3 (CLOX)			
		17.5 (DCLOX)		8.0 (DCLOX)			
		14.9 (OXA)		6.6 (OXA)			
		36.2 (NFC)		9.3 (NFC)			

^a En **ppb** si no se indica lo contrario; ^b Referidos como IC₃₀.

Abreviaturas: **Ab**, anticuerpo; **AMOX**, amoxicilina; **AMP**, ampicilina; **antiPENG**, anticuerpo selectivo frente a PENG; **AP**, fosfatasa alcalina; **AuE**, electrodo de oro; **AuNPs**, nanopartículas de oro; **CBC**, carbencilina; **CEF**, cefapirina; **CFL**, cefalexina; **CFQ**, cefquinoma; **CFX**, cefalexina; **CLOX**, cloxacilina; **CPZ**, cefoperazona; **CTF**, ceftiofur; **DCLOX**, dicloxacilina; **EIS**, espectroscopía de impedancia electroquímica; **ELISA**, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas; **FI**, análisis por inyección en flujo; **FIA**, fluoroinmunoensayo; **GOD**, glucosa oxidasa; **ID**, intervalo dinámico; **LD**, límite de detección; **mAb**, anticuerpo monoclonal; **MTI**, metilicina; **NFC**, nafcilina; **o/n**, durante la noche; **OXA**, oxacilina; **pAb**, anticuerpo policlonal; **PENG**, penicilina G; **PENV**, penicilina V; **ppb**, partes por billón; **ProtG**, proteína G; **SBC**, sulbencilina; **SPR**, resonancia de plasmón superficial.

Tabla 2.8. Comparación de las características analíticas de los ensayos de afinidad basados en el uso de proteínas receptoras para la determinación de antibióticos β -lactámicos en leche.

Protocolo de ensayo	Tipo de detección	ID / ppb	LD / ppb	Tratamiento de muestra	Tiempo de ensayo	Referencia
PBP inmovilizada por adsorción sobre un SPE-RC. Formato de ensayo competitivo entre PENG y 7-ACA-GOD	Amperométrica (350 mV vs. Ag/AgCl)	—	5 (PENG)	—	6 min	[Setford, 1999]
Superficie sensora modificada con un dipéptido. La muestra se mezcla y se incuba con un tripéptido y la enzima R39. Posteriormente se adiciona un anti-dipéptido y la mezcla se inyecta sobre la superficie sensora	SPR	—	2.6 (PENG)	—	9 min	[Gustavsson, 2002 ^a]
Superficie sensora modificada con la molécula orgánica H1. Se inyecta el conjugado CFC-antiH1 y posteriormente se inyecta una mezcla de la muestra y R39. Si la muestra contiene β -lactamas, éstas se unirán a la R39, evitando su unión a la superficie modificada	SPR	—	1 (PENG) 5 (AMP) 4 (AMOX) 7 (CLOX) 11 (OXA) 6 (CFX) 2 (CFC) 3 (CEF)	—	7 min	[Gustavsson, 2002 ^b]
La muestra se mezcla y se incuba con una PBP. A continuación se adiciona DIG-AMP y se incuba nuevamente. Esta mezcla se inyecta entonces sobre la superficie del sensor modificada con antiDIG	SPR	—	2 (PENG) 7 (AMP) 8 (AMOX) 15 (CLOX)	Tratamiento térmico y centrifugación	40 min	[Cacciatore, 2004]
La muestra se mezcla y se incuba con un tripéptido y R39, que convierte el tripéptido en dipéptido, reacción inhibida en presencia de β -lactamas a) tras adición de un anti-dipéptido a la muestra, la mezcla se inyecta sobre la superficie sensora modificada con el dipéptido b) tras adición de un anti-tripéptido a la muestra, la mezcla se inyecta sobre la superficie sensora modificada con el tripéptido	SPR	b) 1.5 – 5.0	a) 1.2 (PENG) b) 1.5 (PENG)	—	7 min	[Gustavsson, 2004; Sternesjö, 2006]
PBP inmovilizada por adsorción. Después de adicionar la muestra, se añade el reactivo bifuncional DIG-AMP. En la etapa de detección se utiliza un antiDIG marcado con HRP	Espectrofotométrica	—	—	—	125 min	[Lamar, 2007]

Tabla 2.8. (Continuación).

Protocolo de ensayo	Tipo de detección	ID / ppb	LD / ppb	Tratamiento de muestra	Tiempo de ensayo	Referencia
Ensayo competitivo directo con proteína de reconocimiento del carboxilo terminal de las penicilinas BlaR-CTD de <i>Bacillus licheniformis</i> inmovilizada sobre placa ELISA y AMP-HRP	Espectrofotométrica	—	2.10 – 31.13 (15 antibióticos β-lactámicos)	—	60 min (+ preparación placa: o/n + bloqueo: 12 h)	[Peng, 2013]
Ensayo competitivo directo con sPBP3* de <i>S. pneumoniae</i> inmovilizada sobre placa ELISA y AMP-HRP	Espectrofotométrica	—	0.26 – 109.46 (para 11 penicilinas y 16 cefalosporinas)	Centrifugación	40 min (+ preparación placa: 16 h + bloqueo: 2 h)	[Zhang, 2013]
PBP inmovilizada en placa ELISA, ensayo competitivo directo con análogos de antibióticos modificados con HRP	Espectrofotométrica	1 – 16 (PENG)	0.75 (PENG)	—	45 min (+ preparación placa: 18 h)	[Zeng, 2013]
		1 – 16 (AMP)	1.22 (AMP)			
		1 – 16 (AMOX)	1.15 (AMOX)			
		1 – 81 (CLOX)	8.23 (CLOX)			
		1 – 81 (DCLOX)	1.24 (DCLOX)			
		1 – 16 (NFC)	1.77 (NFC)			
		1 – 81 (OXA)	0.83 (OXA)			
		10 – 810 (CFX)	27.45 (CFX)			
		0.1 – 8.1 (CTF)	0.08 (CTF)			
		1 – 81 (CFN)	0.99 (CFN)			
		1 – 81 (CFQ)	1.07 (CFQ)			
		1 – 81 (CZL)	1.37 (CZL)			
		10 – 810 (CPZ)	20.52 (CPZ)			
		2 – 32 (CEF)	5.29 (CEF)			
		10 – 810 (CCT)	18.34 (CCT)			

Abreviaturas: 7-ACA-GOD, Ácido 7-aminocefalosporánico modificado con glucosa oxidasa; AMOX, amoxicilina; AMP, ampicilina; antiDIG, anticuerpo selectivo frente a digoxigenina; antiH1, anticuerpo selectivo frente a H1; CCT, cefacetilo; CEF, cefapirina; CFC, cefalosporina C; CFN, cefalonio; CFQ, cefquinoma; CFX, cefalexina; CLOX, cloxacilina; CPZ, cefoperazona; CTF, ceftiofur; CZL, cefazolina; DCLOX, dicloxacilina; DIG-AMP, ampicilina marcada con digoxigenina; dipéptido: (Ac-L-Lys-D-Ala); ELISA, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas; HRP, peroxidasa; ID, intervalo dinámico; LD, límite de detección; NFC, nafcilina; o/n, toda la noche; OXA, oxacilina; PBP, proteína fijadora de penicilina; PENG, penicilina G; ppb, partes por billón; tripéptido, (Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala); R39, DD-carboxipeptidasa de *Actinomadura* R39; sPBP3*, forma soluble de la PBP 3; SPE-RC, electrodo serigrafiado con electrodo de trabajo rodinado; SPR, resonancia de plasmón superficial.

Tabla 2.9. Comparación de los métodos electroquímicos descritos para la determinación de antibióticos β -lactámicos en leche.

Protocolo para la determinación	Condiciones	pH medio de medida	ID	Sensibilidad	LD	Tratamiento de muestra	Referencia
Biosensor potenciométrico con penicilinas inmovilizadas sobre electrodo de pH mediante entrecruzamiento con GA	Medida de la diferencia de potencial	7.0	2 – 12 mM (PENV)	—	—	—	[Meier, 1991]
Biosensor potenciométrico con penicilinas inmovilizadas sobre una membrana de nitrato de celulosa y un electrodo de pH como transductor	Medida de la diferencia de potencial	7.2	—	—	1 μ M (PENG, AMOX, AMP)	Filtración	[Park, 2004]
Biosensor amperométrico enzimático. GCE modificado con MWCNTs, hemateína y β -lactamasa	$E_{\text{detección}}: -0.2 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl)	6.8	—	$0.096 \text{ nA } \mu\text{M}^{-1}$ (PENV)	19 (PENV)	Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y centrifugación	[Chen, 2010]
SWV sobre electrodo de gota colgante de mercurio	$E_{\text{detección}}: -0.91 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl)	2.5	$52.4 - 524 \text{ ng mL}^{-1}$ (CTF)	$-0.64 \text{ } \mu\text{A M}^{-1}$	1.86 ng mL^{-1} (CTF)	Precipitación con acetonitrilo:H ₂ O y centrifugación	[Barbosa, 2011]

Abreviaturas: AMOX, amoxicilina; AMP, ampicilina; CTF, ceftiofur; E, potencial; GA, glutaraldehído; GCE, electrodo de carbono vitrificado; ID, intervalo dinámico; LD, límite de detección; MWCNTs, nanotubos de carbono de pared múltiple; PENG, penicilina G; PENV, penicilina V; SWV, voltamperometría de onda cuadrada.

2.5.3 Métodos descritos para la determinación de sulfonamidas en leche

Mientras que a finales de los años 50 existían ya métodos electroquímicos para el análisis de sulfonamidas y se pensaba que no había necesidad de desarrollar nuevos métodos analíticos para la detección de estos analitos [Voorhies, 1958], la determinación de estos antibióticos en diversas muestras no era posible debido a las elevadas corrientes residuales registradas, por lo que sólo se podía detectar la presencia de estos fármacos, pero no era posible su cuantificación.

Para la determinación de sulfonamidas se han descrito diversos métodos, incluyendo HPLC, LC-MS, GC y electroforesis capilar, entre otros [Wang, 2006; Adrian, 2009^a; Centi, 2010; Arvand, 2011]. Los métodos cromatográficos presentan la dificultad de la extracción selectiva de las sulfonamidas de la muestra debido al carácter polar de estos analitos y a los componentes de la matriz [Stolker, 2005]. Se ha propuesto también la determinación de residuos de sulfonamidas mediante electroforesis en un microchip, realizando una derivatización de los analitos con fluorescamina. Con este método fue posible la determinación en muestras de leche, tras desproteínización y centrifugación, obteniendo LDs comprendidos entre 0.2 y 2.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ [Wang, 2012].

Se han desarrollado inmunoensayos para la detección individual de diversas sulfonamidas, sin embargo, debido a que el número de fármacos es elevado, es más interesante desde un punto de vista práctico el desarrollo de un inmunoensayo que permita la detección conjunta de los diversos antibióticos pertenecientes a la familia de las sulfonamidas [Zhang, 2009]. En la **Tabla 2.10** se recogen las características analíticas obtenidas con los diferentes inmunoensayos propuestos para la detección de sulfonamidas en leche, tanto para especies individuales, como para la multidetección de los antibióticos pertenecientes a esta familia.

Las sulfonamidas son especies electroactivas que pueden ser oxidadas electroquímicamente en el grupo NH_2^- y reducidas en el grupo SO_2^{2-} [Voorhies, 1958]. El potencial de reducción depende fuertemente del sustituyente *R*, que sin embargo tiene poca o ninguna influencia en el potencial de oxidación [Braga, 2010]. Las sulfonamidas *p*-amino sustituidas exhiben un proceso de oxidación irreversible de dos electrones cuyo potencial depende del pH [Momborg, 1984].

La cromatografía líquida se ha acoplado a la detección electroquímica para la determinación de sulfonamidas, ejemplos de ello lo constituyen métodos de HPLC con detección amperométrica sobre un electrodo de carbono vitrificado [Pingarrón, 1992] o sobre un electrodo de diamante dopado con boro [Rao, 2000; Preechaworapun, 2006] y LC con detección amperométrica sobre un electrodo de oro policristalino [Casella, 2012]. Se ha descrito también el uso de MIPs para la extracción de analitos en HPLC [Sun, 2012] o LC-MS/MS [Chen, 2009] y como fase estacionaria en HPLC [Zheng, 2001; Zheng, 2004; Liu, 2006].

Se ha descrito la determinación de sulfametazina mediante voltamperometría de onda cuadrada sobre un electrodo de carbono vitrificado tras preconcentración usando un MIP. El método permitió la determinación en leche, tras precipitación y centrifugación, con un ID comprendido entre 2.0×10^{-6} y 4.0×10^{-4} M y un LD de 3.0×10^{-7} M [Guzmán-Vázquez de Prada, 2005]. Por otro lado, la determinación potenciométrica de sulfametoxazol empleando un MIP

como ionóforo en una membrana de PVC fue aplicada a muestras de leche, obteniendo un ID de 0.1 μM a 1 mM y un LD de 63 nM [Arvand, 2011].

La determinación fluorimétrica de sulfonamidas se reportó con un método de cribado multivariante, que permitió la detección de seis sulfonamidas en leche, empleando fluorescamina para la determinación, un compuesto que reacciona con las aminas primarias dando lugar a derivados fluorescentes [Rodríguez, 2010]. Una de las desventajas de este método es que es poco selectivo, ya que tanto los aminoácidos, como las proteínas presentes en la muestra pueden reaccionar también con este compuesto.

Entre los métodos basados en SPR se ha descrito la detección de 20 sulfonamidas en tejido porcino empleando el *kit* comercial Qflex® (Biacore International, S.A.), inmovilizando un análogo de sulfonamida sobre el chip de SPR y empleando una proteína enlazante de sulfonamidas como elemento de reconocimiento, obteniéndose un límite de detección de 2.74 ng mL⁻¹ y pudiendo analizar 40 muestras en 5 h [McGrath, 2005]. Se han descrito también otros métodos basados en SPR que proporcionan una detección rápida de entre 5 y 10 min por muestra, pero todos ellos son caros, el análisis de un elevado número de muestras requiere tiempos elevados y la multidetección es limitada [Keizer, 2008].

Tabla 2.10. Comparación de las características analíticas de los diferentes inmunoensayos descritos para la determinación de sulfonamidas en leche.

Protocolo del inmunoensayo	Tipo de detección	IC ₅₀ ^a	ID ^a	LD ^a	Tratamiento de muestra	Tiempo de ensayo	Referencia
Inmunoensayo competitivo indirecto con pAb inmovilizado	SPR	—	—	< 1 nM (SMZ)	Centrifugación	30 min (+ preparación del chip: 3 h 40 min)	[Sternesjö, 1995]
ELISA competitivo directo	Espectrofotométrica	0.15 (SMZ)	—	—	Centrifugación	1 h 15 min (+preparación placa ELISA: o/n)	[Fránek, 1999]
ELISA competitivo indirecto	Espectrofotométrica	6.5 (SCP en PBST) 7.2 (SCP en leche)	—	0.65 (SCP en PBST) 0.42 (SCP en leche)	Adición de MeOH y centrifugación	4h 10 min (+preparación placa ELISA: o/n)	[Spinks, 2001]
FLISA competitivo con un compuesto de Eu(III) como fluoróforo	Fluorimétrica	0.019 – 13 (18 sulfonamidas)	—	—	Desproteización y centrifugación	30 min	[Korpimäki, 2004]
ELISA competitivo directo	Espectrofotométrica	0.9 – 294.1 ^b (para 19 sulfonamidas)	—	0.2 – 65.2 ^b (para 19 sulfonamidas)	Centrifugación	1 h y 15 min (+preparación placa ELISA: o/n)	[Franeek, 2006]
FLISA competitivo directo con mAb enlazado covalentemente a nanocristales Qdot	Fluorimétrica	4.3 (SMZ)	—	0.6 (SMZ)	Precipitación y centrifugación	1 h (+preparación placa FLISA: 3 h)	[Shen, 2007]
Inmunoensayo competitivo directo con Ab inmovilizado covalentemente sobre MBs modificadas con grupos tosilo	a) Magnetosensor (Amperométrica) b) Magneto-ELISA (Espectrofotomét.)	a) 6.37 (SPY) b) 9.8 (SPY)	a) 1.05 – 43.76 (SPY) b) 0.74 – 46.22 (SPY)	a) 0.36 (SPY) b) 0.23 (SPY)	Dilución 1/4	a) 30 min b) 60 min (+ modificación MBs: 72 h)	[Zacco, 2007]
Inmunoensayo competitivo indirecto mediante citometría de flujo con derivado de STZ conjugado con OVA inmovilizado sobre micropartículas de PS, anticuerpo biotinilado y fluoróforo marcado con estreptavidina	Fluorimétrica	84.6 (SMX)	—	—	Filtración	1 h incubación (+ modificación micropartículas ~4 h)	[Keizer, 2008]

Tabla 2.10. (Continuación).

Protocolo del inmunoensayo	Tipo de detección	IC ₅₀ ^a	ID ^a	LD ^a	Tratamiento de muestra	Tiempo de ensayo	Referencia
ELISA competitivo directo a) Ab inmovilizado en placa ELISA b) Ab inmovilizado covalentemente sobre MBs	Espectrofotométrica	a) 4.6 (SPY) b) 6.3 (SPY)	—	a) 0.22 (SPY) b) 0.38 (SPY)	—	60 min a) preparación placa ELISA: o/n b) modificación MBs: 135 min	[Font, 2008]
ELISA competitivo indirecto, inmovilizando análogo de sulfonamida conjugado con OVA	Espectrofotométrica	14.3 (SPY)	2.10 – 96.0 (SPY)	0.65 (SPY)	Dilución 1/5	90 min (+ modificación placa ELISA: o/n)	[Adrian, 2009 ^a]
Análogo de sulfonamida conjugado con OVA inmovilizado sobre un chip con dextrano fotopolimerizable	Medida de las variaciones del índice de refracción en un WIOS (detección óptica)	6.3 (SPY)	1.4 – 26.4 (SPY)	0.5 (SPY)	Dilución 5 – 20 veces	< 30 min	[Adrian, 2009 ^b]
pAb inmovilizado sobre GCE modificado con nanocompósito de CeO ₂ –quitosano	DPV	—	0.5 – 500 (SMX)	0.325 (SMX)	—	20 min (+ preparación del sensor ~1 h)	[Cai, 2012]
ELISA competitivo indirecto con mAb y análogo de antibiótico modificado con OVA inmovilizado	Espectrofotométrica	1.2 – 12.4 (para 12 sulfonamidas)	—	—	—	90 min (+preparación placa ELISA: o/n y bloqueo: 2 h)	[Wang, 2013]

^a En **ppb** si no se indica lo contrario; ^b Referidos como IC₂₀.

Abreviaturas: **Ab**, anticuerpo; **DPV**, voltamperometría diferencial de impulsos; **ELISA**, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas; **FLISA**, ensayo por inmunoabsorción ligado a fluoróforos; **GCE**, electrodo de carbono vitrificado; **ID**, intervalo dinámico; **LD**, límite de detección; **mAb**, anticuerpo monoclonal; **MBs**, partículas magnéticas; **MeOH**, metanol; **o/n**, durante la noche; **OVA**, ovoalbúmina; **pAb**, anticuerpo policlonal; **ppb**, partes por billón; **PS**, poliestireno; **Qdot**, puntos cuánticos; **SCP**, sulfacloropiridazina; **SMX**, sulfametoxazol; **SMZ**, sulfametazina; **SPR**, resonancia de plasmón superficial; **SPY**, sulfapiridina; **STZ**, sulfatiazol; **WIOS**, sistema óptico interrogado por longitud de onda.

2.5.4 Métodos descritos para la determinación de tetraciclinas en leche

Se han descrito diferentes métodos para la determinación de tetraciclinas, incluyendo métodos cromatográficos y de electroforesis capilar [Oka, 2000; Samanidou, 2007]. Sin embargo, debido a la capacidad de las tetraciclinas de complejar iones metálicos, pudiendo interaccionar también con los grupos silanol de las fases estacionarias basadas en sílice durante las separaciones cromatográficas, se requiere la adición de agentes complejantes como ácido oxálico o sales de AEDT para poder llevar a cabo la extracción de la muestra y su separación cromatográfica [Stolker, 2005; Jeon, 2008^{a,b}].

La capacidad de enlazar cationes metálicos se ha aprovechado en diversos métodos de detección óptica en los que se forman complejos de Eu(III). Así, fue diseñado un optosensor de fosforescencia para la detección de cuatro tetraciclinas en agua y leche en un sistema de cribado con respuesta si/no [Traviesa-Alvarez, 2007]. Se ha descrito también la determinación de CTC mediante medidas de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF) en una interfase agua/tetraclorometano, en la que la interacción del complejo Eu(III)–CTC con óxido de trioctilfosfina origina un aumento de la señal de TIRF, proporcional a la concentración de CTC, obteniéndose un intervalo cuantificable comprendido entre 0.017 y 1.0 μM , con un LD de 2 nM. El método se aplicó a la determinación en orina, suero y leche (tras dilución) en un tiempo de análisis de 30 min [Feng, 2001].

Empleando una cepa luminiscente de *E. coli* se desarrolló un ensayo microbiológico para la detección específica de residuos de tetraciclinas en leche cruda. La incubación de las células con la muestra conteniendo tetraciclina incrementa la emisión de luz. La determinación se realizó en un período de 120 min y requirió de un tratamiento térmico previo de la leche para minimizar las variaciones en el fondo. Los LDs obtenidos para diversas tetraciclinas estuvieron comprendidos entre 2 y 35 ng mL^{-1} [Kurittu, 2000^{a,b}].

Diversos métodos de quimioluminiscencia han sido empleados para la determinación de tetraciclinas, permitiendo obtener atractivas características analíticas, como simplicidad de detección, bajos LDs, amplios IDs y reducidos tiempos de análisis. Sin embargo, presentan una baja selectividad y sólo se han aplicado a la determinación de analitos en preparados farmacéuticos [Xiong, 2006].

Un método espectrofotométrico descrito para la determinación de tetraciclina se basa en la transformación morfológica de nanovarillas de oro como resultado de la interacción entre I_2 y TC. La molécula I_2 induce la fusión de las nanovarillas para dar lugar a agregados esféricos. Dado que la tetraciclina reacciona con I_2 a través de su grupo hidroxibenceno, en presencia de tetraciclina la concentración efectiva de I_2 disminuye, dando lugar al desplazamiento de la señal óptica a mayores longitudes de onda en función de la concentración de TC, en un intervalo lineal comprendido entre 5.0×10^{-5} y 5.0×10^{-4} M, con un LD de 2.4×10^{-6} M. Se determinó tetraciclina en muestras de leche por adiciones estándar, tras calentamiento, centrifugación, filtrado y concentración de la muestra [Wang, 2009^a].

Se han descrito también diversos inmunoensayos para la detección de tetraciclinas, aunque sólo unos pocos se han empleado para la determinación en muestras de leche. En la **Tabla 2.11** se comparan sus características analíticas.

Tabla 2.11. Comparación de las características analíticas de los diferentes inmunoensayos descritos para la determinación de tetraciclinas en leche.

Protocolo del inmunoensayo	Tipo de detección	IC ₅₀ / ppb	ID / ppb	LD / ppb	Tratamiento de muestra	Tiempo de ensayo	Referencia
ELISA competitivo indirecto	Espectrofotométrica	3.9×10 ³ (TC) 3.5×10 ³ (CTC) < 2.0×10 ⁵ (OTC)	(0.1 – 100)×10 ³ (TC)	10 (TC)	Dilución 1/20	5.5 h (+preparación placa ELISA: o/n)	[Zhang, 2007]
ELISA competitivo indirecto	Espectrofotométrica	—	0.14 – 140 (TC)	0.048 (TC)	Desproteinización	3 h 10 min (+preparación placa ELISA: 3 h)	[Jeon, 2008 ^a]
ELISA competitivo indirecto con análogo de antígeno modificado con OVA y mAb	Espectrofotométrica	13.2 (DXC) 19.4 (TC) 14.1 (OTC) 20.3 (CTC) 28.1 (MNC) 12.9 (MTC) 27.0 (DMC)	—	1.6 (DXC) 4.6 (TC) 2.0 (OTC) 5.4 (CTC) 6.9 (MNC) 1.5 (MTC) 6.5 (DMC)	Desproteinización y centrifugación	1 h 45 min (+preparación placa: o/n)	[Gao, 2013]

Abreviaturas: CTC, clortetraciclina; DMC, demeclociclina; DXC, doxiciclina; ELISA, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas; ID, intervalo dinámico; LD, límite de detección; mAb, anticuerpo monoclonal; MNC, minociclina; MTC, metaciclina; o/n, durante la noche; OTC, oxitetraciclina; OVA, ovoalbúmina; ppb, partes por billón; TC, tetraciclina.

La técnica de SPR se ha empleado para la detección de tetraciclinas en un ensayo indirecto en el que se empleó el operador tet (*tetO*) y una doble hélice de DNA biotinilada que enlaza la proteína represora TetR inmovilizada sobre un chip modificado con estreptavidina. Las tetraciclinas presentes en la muestra se unen a dicha proteína represora, induciendo un cambio conformacional en la misma, acompañado por la disminución de la constante de afinidad de TetR por *tetO*, permitiendo obtener un cambio en la señal de SPR proporcional a la concentración de tetraciclinas. Este método se empleó para la determinación de tetraciclinas en miel, leche desnatada tras dilución y leche cruda, tras dilución, tratamiento térmico durante 5 min a 95 °C y centrifugación. Para esta última muestra se obtuvo un intervalo cuantificable comprendido entre 50 y 200 µg kg⁻¹, con un LD de 15 µg L⁻¹ [Moeller, 2007].

Se ha descrito la síntesis de membranas de poliacrilonitrilo para la impronta molecular y reconocimiento de tetraciclina [Trotta, 2005] y diversos MIPs selectivos frente a tetraciclinas [Cai, 2004]. Los MIPs han sido empleados principalmente en extracción en fase sólida, tanto en métodos de HPLC [Caro, 2005; Jing, 2010] como en inyección en flujo con detección por quimioluminiscencia [Xiong, 2006]. Se han utilizado también en la fabricación de sensores para la determinación de tetraciclinas, así se empleó un electrodo de oro modificado con un MIP como anticuerpo artificial para la determinación de OTC, estableciendo una competición entre OTC y un análogo de OTC modificado con HRP. Tras una reacción de competición con la muestra durante 12 min y tras 27 min de preincubación con OTC y OTC-HRP, el sensor electroquímico descrito se incubó con el sustrato enzimático e hidroquinona (HQ) como mediador redox durante 3 min, realizándose medidas por DPV. La determinación de OTC fue posible hasta una concentración 10⁻⁷ M, con un LD de 6.49×10⁻¹⁰ M. El método se aplicó a la determinación de OTC en muestras de leche, previa precipitación de proteínas y centrifugación [Li, 2010]. Se desarrolló también un sensor electroquímico de impronta molecular basado en un electrodo de oro modificado con β-ciclodextrina, nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs), compósitos de nanopartículas de oro y un dendrímero de poliamidoamina (PAMAM), usando un derivado de quitosano como monómero funcional, para la determinación de CTC en un intervalo de concentraciones comprendido entre 9.0×10⁻⁸ y 5.0×10⁻⁵ M (46.4 a 25767 ppb), con un LD de 4.954×10⁻⁸ M (25.5 ppb) [Lian, 2012].

Se ha descrito la síntesis y aislamiento de aptámeros de RNA con capacidad de reconocimiento de tetraciclina [Berens, 2001], así como un amplio número de metodologías para la detección de tetraciclinas mediante el uso de diversos aptámeros de DNA. En la **Tabla 2.12** se recogen las características analíticas de los diferentes aptasensores desarrollados para la determinación de tetraciclinas en leche.

Además, debido a que las tetraciclinas contienen un sustituyente fenólico en la posición 10 y un sustituyente dimetilamino en la posición 4 que pueden ser oxidados [Masawat, 2007], son sustancias electroactivas y se pueden emplear métodos electroquímicos para su detección directa. En la **Tabla 2.13** se resumen los diferentes métodos basados en técnicas electroquímicas para la detección de tetraciclinas.

Tabla 2.12. Comparación de las características analíticas de diferentes sensores basados en el uso de aptámeros para la determinación de tetraciclinas en leche.

Inmovilización del aptámero	Tipo de detección	ID	LD	Tratamiento de muestra	Referencia
ssDNA inmovilizado sobre GCE mediante activación con EDC/NHS	CV	0.1 – 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (TC)	1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (TC)	—	[Zhang, 2010 ^a]
Ensayo competitivo indirecto con aptámeros biotinilados inmovilizados sobre placa ELISA modificada con neutravidina y TC-HRP: a) ssDNA b) RNA	Espectrofotométrica	a) $1.99 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-4}$ M (TC) b) $3.16 \times 10^{-8} - 3.2 \times 10^{-4}$ M (TC)	a) 3.27×10^{-8} M (TC) b) 2.10×10^{-8} M (TC)	Desproteinización y centrifugación	[Jeong, 2012]
ssDNA inmovilizado sobre GCE modificado con MWCNTs	DPV	$1 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-5}$ M (TC)	5×10^{-9} M (TC)	Dilución y centrifugación	[Zhou, 2012]
ssDNA biotinilado empleado en ensayo competitivo indirecto en una placa ELISA modificada con OTC-BSA y posterior etapa de incubación con estreptavidina-HRP	Espectrofotométrica	—	12.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (OTC)	Desproteinización y centrifugación	[Kim, 2014]

Abreviaturas: BSA, albúmina de suero bovino; CV, voltamperometría cíclica; DPV, voltamperometría diferencial de impulsos; EDC, carbodiimida; ELISA, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas; GCE, electrodo de carbono vitrificado; HRP, peroxidasa; ID, intervalo dinámico; LD, límite de detección; MWCNTs, nanotubos de carbono de pared múltiple; NHS, *N*-hidroxisuccinimida; OTC, oxitetraciclina; ssDNA, DNA monocatenario; TC, tetraciclina.

Tabla 2.13. Comparación de los métodos basados en detección electroquímica para la determinación de tetraciclinas en leche.

Protocolo para la determinación	Condiciones	pH medio de medida	ID	Sensibilidad	LD	Tratamiento de muestra	Referencia
Ensayo competitivo con MIP inmovilizado sobre AuE y análogo de antibiótico modificado con HRP	DPV con HQ y H ₂ O ₂ en disolución	7.2	—	215.88 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ (OTC)	6.49 $\times 10^{-10}$ M (OTC)	Desproteínización	[Li, 2010]
Detección amperométrica sobre AuE decorado con CD-MWCNTs, Au-PAMAM y quitosano incorporando un MIP	E _{detección} : 500 mV (vs. Ag/AgCl)	—	46.4 – 25767 ppb (CTC)	196.13 nA μM^{-1} (CTC)	25 ppb (CTC)	Dilución y filtración	[Lian, 2012]
DPV sobre GCE modificado con una película de DNA por irradiación UV	E _{pico anódico} : 0.89 V (vs. Ag/AgCl)	3.0	0.30 – 90.00 μM (TC)	—	0.27 μM (TC)	—	[Gholivand, 2013]

Abreviaturas: AuE, electrodo de oro; Au-PAMAM, nanocompuestos de nanopartículas de oro y dendrímero de poliamidoamina; CD, ciclodextrina; CTC, clortetraciclina; DPV, voltamperometría diferencial de impulsos; E, potencial; GCE, electrodo de carbono vitrificado; HQ, hidroquinona; HRP, peroxidasa; ID, intervalo dinámico; LD, límite de detección; MIP, polímero de impronta molecular; MWCNTs, nanotubos de carbono de pared múltiple; OTC, oxitetraciclina; ppb, partes por billón; TC, tetraciclina; UV, ultravioleta.

2.5.5 Métodos descritos para la multidetección de antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias de antibióticos en leche

Entre los métodos desarrollados para la multidetección de residuos de antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias de antibióticos se han descrito diversos inmunoensayos cuyas características analíticas se resumen en la **Tabla 2.14**. Por otro lado, la **Tabla 2.15** resume las características analíticas de los métodos basados en detección electroquímica para la multideterminación de residuos de antibióticos.

Otros métodos descritos se basan en el empleo de medios bacterianos para la multidetección de antibióticos. Utilizando seis placas con diferentes inóculos de bacterias se determinaron 23 sustancias antimicrobianas tras una incubación durante 6 a 18 h, dependiendo del antibiótico a determinar [Althaus, 2009]. Se han descrito también ensayos microbiológicos para la detección de β -lactamas y tetraciclinas empleando *Geobacillus stearothermophilus*, púrpura de bromocresol y cloranfenicol en el medio de cultivo o quinolonas y sulfonamidas empleando *Bacillus subtilis*, trifeniltetrazolio-azul de toluidina y trimetoprima, lo que permitió la detección de residuos de 27 antibióticos pertenecientes a estas cuatro familias a niveles próximos a sus respectivos LMRs, pero requiriendo tiempos de incubación comprendidos entre 2.45 y 5.5 h [Nagel, 2012].

Se emplearon proteínas reguladoras sensibles a la presencia de antibióticos para la detección de tetraciclinas, estreptograminas y macrólidos. Empleando un DNA de interacción específica a estas proteínas, biotinilado y enlazado a una placa ELISA modificada con estreptavidina fue posible la cuantificación de antibióticos en muestras de leche y suero en un tiempo de 3 h, obteniéndose LDs entre 0.1 y 605 ng mL⁻¹ [Weber, 2005].

Se ha descrito también un ensayo para la detección óptica de tetraciclina, estreptograminas y macrólidos en suero, carne y leche, empleando una tira reactiva de nitrocelulosa recubierta con estreptavidina sobre la que se inmoviliza un DNA de captura biotinilado, consistente en los operadores tetO, PIR y ETR capaces de enlazar selectivamente las proteínas bacterianas de regulación transcripcional, previamente marcadas con un *tag* de histidinas, TetR, PIP y E, respectivamente. Los residuos de antibióticos presentes en la muestra se unen específicamente a estas proteínas bacterianas, ocasionando su cambio conformacional y su consiguiente liberación del DNA de captura. En una etapa posterior se adiciona un anticuerpo marcado con peroxidasa que reconoce el *tag* de histidinas y tras adición de H₂O₂ y TMB se evalúa la presencia de antibióticos. El ensayo permitió obtener LDs 40 veces inferiores a los LMRs establecidos en un tiempo de análisis de 35 min [Link, 2007].

Tabla 2.14. Comparación de las características analíticas de diferentes inmunoensayos descritos para la multidetección de antibióticos en leche.

Protocolo del inmunoensayo	Tipo de detección	IC ₅₀ / ppb	ID / ppb	LD / ppb	Tratamiento de muestra	Tiempo de ensayo	Referencia
ELISA competitivo indirecto	Espectrofotométrica	—	—	14 (STM) 20 (SDZ) 13 (SMZ) 1.7 (CLOX)	—	15 min (+preparación placa ELISA: o/n)	[Strasser, 2003 ⁹]
Inmunoensayo competitivo indirecto con análogos de antibióticos inmovilizados sobre chip de vidrio modificado con GOPS	Quimioluminiscencia medida con una cámara CCD	7.3 (PENG) 0.64 (CLOX) 0.26 (CEF) 7.7 (SDZ) 11.1 (SMZ) 11.6 (STM) 24.8 (GENT) 75 (NEO) 0.83 (ERI) 2.2 (TIL)	3.30 – 41.3 (PENG) 0.29 – 3.63 (CLOX) 0.12 – 1.45 (CEF) 3.49 – 43.5 (SDZ) 4.93 – 63.0 (SMZ) 5.06 – 66.0 (STM) 12.1 – 141 (GENT) 31.8 – 427 (NEO) 0.36 – 4.70 (ERI) 0.95 – 12.6 (TIL)	—	—	~3 min (+preparación del chip: ~18 h)	[Knecht, 2004]
Inmunoensayo en un lab-on-a-chip empleando mAbs frente a PENG y DHSTM y anticuerpo secundario marcado con reactivo fluorescente	Microscopía de fluorescencia	—	—	—	—	2 h	[Choi, 2006]
ELISA (FQs, SAs) + ELRA (β-LMs) competitivo indirecto con análogos de antibióticos inmovilizados sobre placa ELISA	Espectrofotométrica	0.77 (CIP) 0.81 (SPY) 2.97 (AMP)	—	—	Dilución 1/5	90 min (+preparación placa ELISA: o/n)	[Adrian, 2008]
FLISA competitivo indirecto con análogos de antibiótico inmovilizados sobre placas de vidrio formando una placa ELISA convencional	Fluorimétrica	11.85 (SMZ) 7.18 (STM) 21.62 (TIL)	3.26 – 53.2 (SMZ) 2.01 – 26.4 (STM) 6.37 – 36.5 (TIL)	3.26 (SMZ) 2.01 (STM) 6.37 (TIL)	—	60 min (+preparación placa vidrio: o/n)	[Bang-Ce, 2008]
Inmunoensayo competitivo indirecto con análogos de antibióticos inmovilizados sobre un chip de vidrio con dextrano fotopolimerizable	Medida de las variaciones del índice de refracción en un WIOS (detección óptica)	6.3 (SPY) 19.7 (CIP) 26.2 (AMP) 114.8 (OTC)	1.4 – 26.4 (SPY) 4.4 – 70.3 (CIP) 7.1 – 100.0 (AMP) 56.8 – 193.3 (OTC)	0.5 (SPY) 1.3 (CIP) 3.1 (AMP) 34.2 (OTC)	—	40 min	[Adrian, 2009 ⁹]

Tabla 2.14. (Continuación).

Protocolo del inmunoensayo	Tipo de detección	IC ₅₀ / ppb	ID / ppb	LD / ppb	Tratamiento de muestra	Tiempo de ensayo	Referencia					
Inmunoensayo competitivo indirecto con análogos de antibióticos inmovilizados sobre chip de vidrio modificado con PEG	Quimioluminiscencia medida con una cámara CCD	22.3 (SMZ)	20 – 30 (SMZ)	—	—	6 min (+preparación del chip: 15 h)	[Kloth, 2009]					
		25.5 (SDZ)	3.1 – 440 (SDZ)									
		32.8 (STM)	21 – 608 (STM)									
		3.9 (CLOX)	0.5 – 320 (CLOX)									
		173 (AMP)	1.7 – 1800 (AMP)									
		24.6 (PENG)	3.0 – 320 (PENG)									
		42.1 (CEF)	0.8 – 797 (CEF)									
		298 (NEO)	135 – 2300 (NEO)									
		21.5 (GENT)	6.8 – 540 (GENT)									
		1.2 (ERI)	0.1 – 45 (ERI)									
7.1 (TIL)	0.6 – 120 (TIL)	—	—	6 min (+preparación del chip: 15 h)	[Kloth, 2009]							
1.6 (ENRO)	0.5 – 6.3 (ENRO)											
0.63 (TC)	0.05 – 43 (TC)											
Inmunoensayo competitivo indirecto en un chip de SPR	SPR	105.4 (GENT)	—	—	Filtración y dilución	16 min (+preparación del chip: 70 min)	[Raz, 2009]					
		0.9 (KAN)										
		50.1 (STM)										
		9.2 (ENRO)										
		30.3 (CAP)										
10.1 (SMZ)	—	—	Leche cruda	10 min	[Suárez, 2009]							
Inmunoensayo competitivo indirecto con análogos de antibióticos inmovilizados sobre un chip de vidrio integrado en un sistema automatizado						Medida de las variaciones del índice de refracción en un WIOS (detección óptica)						
Inmunoensayo competitivo indirecto con análogos de antibióticos inmovilizados sobre una m-SAM						SPR	2.90 (ENRO)	—	0.34 (ENRO)	Dilución 1/5	30 min (+preparación chip SPR: o/n)	[Fernández, 2010]
							2.03 (SPY)		0.43 (SPY)			
							2.92 (CAP)		0.22 (CAP)			

Tabla 2.14. (Continuación).

Protocolo del inmunoensayo	Tipo de detección	IC ₅₀ / ppb	ID / ppb	LD / ppb	Tratamiento de muestra	Tiempo de ensayo	Referencia
FLISA competitivo indirecto	Fluorimétrica	0.77 (ENRO) 1.58 (SDZ)	—	0.18 (ENRO) 0.17 (SDZ)	Dilución 1/5	60 min (+preparación placa FLISA: 3 h)	[Zhu, 2011]
ELISA colorimétrico dual competitivo indirecto; anticuerpos de detección marcados con AP (quinolonas) y HRP (sulfonamidas)	Espectrofotométrica	1.4 (CIP) 6.2 (SMZ)	—	2.4 (sulfonamidas) 5.8 (quinolonas)	Desproteínización y dilución	85 min (+preparación placa ELISA: o/n; medidas sucesivas)	[Jiang, 2013]

Abreviaturas: β -LMs, antibióticos β -lactámicos; AMP, ampicilina; AP, fosfatasa alcalina; CAP, cloranfenicol; CCD, dispositivo de carga acoplada; CEF, cefapirina; CIP, ciprofloxacina; CLOX, cloxacilina; DHSTM, dihidroestreptomicina; ELISA, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas; ELRA, ensayo por receptores ligado a enzimas; ENRO, enrofloxacin; ERI, eritromicina; FQs, fluoroquinolonas; FLISA, ensayo por inmunoabsorción ligado a fluoróforos; GENT, gentamicina; GOPS, (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano; HRP, peroxidasa; ID, intervalo dinámico; KAN, kanamicina; LD, límite de detección; m-SAM, monocapa autoensamblada mixta; mAb, anticuerpo monoclonal; NEO, neomicina; o/n, durante la noche; OTC, oxitetraciclina; PEG, polietilenglicol; PENG, penicilina G; ppb, partes por billón; SAs, sulfonamidas; SDZ, sulfadiazina; SMZ, sulfametazina; SPR, resonancia de pasmón superficial; SPY, sulfapiridina; STM, estreptomicina; TC, tetraciclina; TIL, tilosina; WIOS, sistema óptico interrogado por longitud de onda.

Tabla 2.15. Comparación de los métodos basados en detección electroquímica descritos para la multidetección de antibióticos en leche.

Protocolo para la determinación	Antibióticos detectados	ID	LD	Tiempo de análisis	Tratamiento de muestra	Referencia
Determinación potenciométrica de la producción de CO ₂ en relación a la inhibición del crecimiento microbiano de <i>E. coli</i>	Tetraciclinas, quinolonas	—	< 25 ppb	120 min	—	[Pellegrini, 2004]
Medida de la variación de los parámetros cinéticos de las señales obtenidas con un biosensor amperométrico de lactato oxidasa como resultado de la respiración bacteriana	Penicilina, cloranfenicol	0.1 – 2.5 ppm (Penicilina)	—	~8 min	Dilución al 35 %	[Rinken, 2006]
Detección de residuos de antibióticos con una <i>lengua</i> electrónica compuesta por 5 electrodos de trabajo (Au, Ag, Pt, Pd, Ti) mediante voltamperometría de impulsos multifrecuencia de larga amplitud	Cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, neomicina, estreptomycin, tetraciclina	—	—	—	—	[Wei, 2011]
Inmunoensayo electroquímico competitivo indirecto con análogos de antibióticos conjugados a BSA inmovilizados sobre un GCE modificado con AuNPs y anticuerpos monoclonales conjugados a CdS y PbS.	Tetraciclina, cloranfenicol	0.01 – 50 (TC y CAP)	7.5 (TC) 5.4 (CAP)	—	—	[Liu, 2013]
Determinación por voltamperometría de redisolución anódica						

Abreviaturas: AuNPs, nanopartículas de oro; BSA, albúmina de suero bovino; CAP, cloranfenicol; GCE, electrodo de carbono vitrificado; ID, intervalo dinámico; LD, límite de detección; ppb, partes por billón; ppm, partes por millón; TC, tetraciclina.

Aunque se han descrito diversas metodologías, tanto para el análisis individual como para la multidetección de residuos de antimicrobianos, sólo una pequeña cantidad de las nuevas plataformas tecnológicas ha sido evaluada en profundidad para su aplicación al análisis de muestras reales y el número de plataformas validadas para este fin es todavía menor. Debido a ello, estas tecnologías han tenido una escasa difusión y aplicación en el análisis rutinario de antibióticos [Raz, 2011]. Además, los métodos desarrollados presentan diversas limitaciones, requieren largos tiempos, protocolos laboriosos, tratamientos complejos de la muestra y personal especializado para el llevar a cabo el análisis o no presentan la sensibilidad requerida por la legislación vigente.

Lo anterior aunado a que las pruebas comerciales existentes y comúnmente aplicadas a la detección de residuos de antimicrobianos en leche son poco fiables, presentan falsos positivos o negativos y son susceptibles a la presencia de interferencias o requieren condiciones especiales para llevar a cabo la detección, pone de manifiesto la necesidad de desarrollar metodologías rápidas, fiables y sencillas para la detección y determinación individual y simultánea de residuos de antibióticos en leche, con capacidad de realizar análisis descentralizados y por personal no especializado, aplicando un mínimo tratamiento a la muestra.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentación

3.2 Reactivos y acrónimos

3.3 Preparación de disoluciones

3.4 Procedimientos experimentales

3.5 Cálculos

3.1 Instrumentación

3.1.1 Aparatos

Las voltamperometrías cíclicas y medidas amperométricas fueron realizadas con un bipotenciostato CHI812B (CH Instruments, Inc.) controlado mediante el software CHI812b. Las medidas cronopotenciométricas se realizaron con un potenciostato/galvanostato EC Epsilon (Bioanalytical Systems, Inc.). Para obtener los espectros de impedancia se empleó un analizador de impedancia electroquímica compacto μ AutolabIII/FRA2 (Metrohm Autolab, B.V.). Las medidas de microscopía electroquímica de barrido fueron registradas con un sistema SECM (Sensolytics GmbH) que incorpora tornillos micrométricos controlados por motores paso a paso y controladores piezoeléctricos para el posicionamiento tridimensional de la sonda, un potenciostato LC-3C Petit Ampère (Bioanalytical Systems, Inc.) o un bipotenciostato Jaissle PG 100 (Jaissle Elektronik GmbH) y una tarjeta AD/DA de 16 bit CIO-DAS 1602/16 (Plug-In electronics) para el control del sistema mediante un software programado empleando Visual Basic 6.0. Las medidas cronoamperométricas realizadas con las células de biocombustible se efectuaron con un potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT30 (Metrohm Autolab, B.V.). Todas las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Otros aparatos utilizados fueron, un agitador magnético MS01 (ELMI, Ltd.), un incubador termostatzado con agitación Optic Ivymen® System (Comecta, S.A.), un agitador vórtex AGT-9 (Bunsen, S.A.), un pH-metro Basic 20+ (Crison Instrments, S.A.) calibrado habitualmente con disoluciones reguladoras de pH 4.01, 7.00 y 9.21 a $(25.0 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$, una placa calefactora RET basic (IKA Works GmbH & Co.) y un baño de ultrasonidos (JP Selecta, S.A.).

3.1.2 Electrodo y accesorios empleados para las medidas electroquímicas

- Electrodo serigrafiados de carbono (**SPCEs**) (DRP-110, DropSens) constituidos por un electrodo de trabajo de carbono ($\varnothing = 4 \text{ mm}$), un contraelectrodo de carbono y un electrodo de pseudoreferencia de plata.
- Electrodo serigrafiados de oro con tinta curada a baja temperatura (**SPAuEs-BT**) (DRP-220BT, DropSens) constituidos por un electrodo de trabajo de oro ($\varnothing = 4 \text{ mm}$), un contraelectrodo de oro y un electrodo de pseudoreferencia de plata.
- Electrodo serigrafiados de oro con tinta curada a alta temperatura (**SPAuEs-AT**) (DRP-220AT, DropSens) constituidos por un electrodo de trabajo de oro ($\varnothing = 4 \text{ mm}$), un contraelectrodo de oro y un electrodo de pseudoreferencia de plata.
- Electrodo serigrafiados duales de carbono (**SPdCEs**) (DRP-C1110, DropSens) constituidos por dos electrodos de trabajo de carbono elípticos (6.3 mm^2 cada uno), un contraelectrodo de carbono y un electrodo de pseudoreferencia de plata.
- Electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl 3 M (Bioanalytical Systems, Inc.)

- Ultramicroelectrodo de fibra de carbono de fabricación propia (ver *Apartado 3.4.8*).
- Alambre de Pt (99.99 %, Goodfellow) empleado como contraelectrodo.
- Electrodo de barra de grafito de 3 mm de diámetro (Sino Carbontec)
- Electrodo de grafito de 6 mm de diámetro (Spectrakohlen Ringsdorff-Werke GmbH)
- Cable conector para electrodos serigrafiados (DRP-CAC, DropSens).
- Cable conector para electrodos serigrafiados duales (DRP-BICAC, DropSens).
- Soporte de fabricación propia para electrodos serigrafiados con imán de neodimio ($\varnothing = 4$ mm, S-04-03-N Supermagnete, Webcraft GmbH) encastrado.
- Célula de vidrio de 10 mL (Pobel, S.A.).

3.1.3 Otra instrumentación empleada

- Concentrador magnético DynaMag™-2 (12321D, Invitrogen Dynal, AS).

3.2 Reactivos y acrónimos

Todos los reactivos y disolventes empleados fueron de calidad para análisis.

3.2.1 Antibióticos

β -lactamas

Amoxicilina, **AMOX** (Sigma-Aldrich)

Sal de sodio de la ampicilina, **AMP** (Sigma-Aldrich)

Sal de sodio de la penicilina G, **PENG** (≥ 98.0 %, Fluka)

Sal de sodio monohidratada de la cloxacilina, **CLOX** (Sigma-Aldrich)

Sal de sodio monohidratada de la oxacilina, **OXA** (Sigma-Aldrich)

Ceftiofur, **CTF** (97.7 %, Fluka)

Sal de sodio de la cefapirina, **CEF** (Fluka)

Tetraciclinas

Clorhidrato de clortetraciclina, **CTC** (Fluka)

Clorhidrato de oxitetraciclina, **OTC** (min. 95 %, Sigma-Aldrich)

Clorhidrato de tetraciclina, **TC** (min. 95 %, Sigma-Aldrich)

Hiclato de doxiciclina, **DXC** (≥ 98 %, Fluka)

Sulfonamidas

Sulfacoloropiridazina, **SCP** (99.4 %, Fluka)

Sulfadiazina, **SDZ** (≥ 99.0 %, Sigma-Aldrich)

Sulfametazina, **SMZ** (≥ 99 %, Sigma-Aldrich)

Sulfapiridina, **SPY** (≥ 99.0 %, Fluka)

Sal de sodio de la sulfacetamida, **SAM** (Sigma-Aldrich)

Sal de sodio de la sulfamerazina, **SMR** (Sigma-Aldrich)

Sal de sodio del sulfatiazol, **STZ** (≥ 99 %, Sigma-Aldrich)

Otros antibióticos

Enrofloxacin, **ENRO** (≥ 98.0 %, Fluka)

3.2.2 Reactivos empleados en la preparación de disoluciones

β -Lactosa (99 %, Sigma-Aldrich)

Ácido cítrico (99.0–102.0 %, J.T. Baker)

Ácido clorhídrico, **HCl** (37 %, $\rho = 1.19 \text{ g mL}^{-1}$, Scharlau)

Ácido nítrico, **HNO₃** (65 %, $\rho = 1.41 \text{ g mL}^{-1}$, Scharlau)

Ácido sulfúrico, **H₂SO₄** (95–97 %, $\rho = 1.84 \text{ g mL}^{-1}$, Scharlau)

Ácido 2-morfolinoetanosulfónico, **MES** (Gerbú)

Albúmina de suero bovino tipo VH, **BSA** (≥ 99 %, Gerbú)

Carbonato de sodio anhidro, **Na₂CO₃** (99.8 %, Panreac)

Caseína de leche bovina en polvo (Sigma-Aldrich)

Citrato de sodio (min. 99 %, J.T. Baker)

Cloruro de cobalto (II), **CoCl₂** (Panreac)

Cloruro de cobre (II), **CuCl₂** (Merck)

Cloruro de hexaaminrutenio (III), **Ru(NH₃)₆Cl₃** (99 %, ABCR GmbH)

Cloruro de sodio, **NaCl** (min. 99 %, Scharlau)

Cloruro de potasio, **KCl** (min. 99.5 %, Scharlau)

Dimetilsulfóxido, **DMSO** (≥ 99.5 %, Sigma-Aldrich)

Dihidrogenofosfato de sodio anhidro, **NaH₂PO₄** (98–100.5 %, Scharlau)

Disolución reguladora de acetato de sodio 3 M (Sigma-Aldrich)

Etanol absoluto, **EtOH** (min. 99.9 %, Scharlau)

Hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado, **K₄Fe(CN)₆** (98.5–102.0 %, Sigma-Aldrich)

Hexacianoferrato (III) de potasio, **K₃Fe(CN)₆** (99.4 %, Sigma-Aldrich)

Hidrogenocarbonato de sodio, **NaHCO₃** (99–101 %, Scharlau)

Hidrogenofosfato disódico anhidro, **Na₂HPO₄** (min. 99 %, Scharlau)

Hidroquinona, **HQ** (99+ %, Sigma-Aldrich)

Hidróxido de sodio, **NaOH** (Panreac)

Imidazol (99 %, Acros Organics)

Monolaurato de sorbitán polioxietilenado (polisorbato 20), **Tween®20** (Sigma-Aldrich)

Nitrato de níquel (II), **Ni(NO₃)₂** (Probus)

Nitrato de plata, **AgNO₃** (99 %, ChemPur)

Nitrato de zinc, **Zn(NO₃)₂** (Probus)

p-Benzoquinona, **BQ** (99+ %, Sigma-Aldrich)

Peróxido de hidrógeno, **H₂O₂** (30 % (p/v) en H₂O, ρ = 1.110 g mL⁻¹, Sigma-Aldrich)

Sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), **ABTS** (≥ 98 %, Sigma-Aldrich)

3.2.3 Reactivos empleados en la funcionalización de las superficies electródicas

Ácido 4-aminobenzoico, **4-ABA** (99 %, Acros Organics)

Clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida, **EDC** (≥ 99.5 %, Sigma-Aldrich)

N-[*N*_α,*N*_α-bis(carboximetil)-*L*-lisina]-12-mercaptododecanamida, **HS-NTA** (≥ 90.0 %, Sigma-Aldrich)

*N*²,*N*²-bis(carboximetil)-*N*⁶-dodecanoil lisina, **LAU-NTA** (sintetizado en laboratorio, ver *Apartado 3.4.3*)

N-Hidroxisuccinimida, **NHS** (98 %, Sigma-Aldrich)

Nitrito de sodio, **NaNO₂** (min. 98.0 %, Panreac)

Perclorato de litio, **LiClO₄** (99.99 %, Sigma-Aldrich)

Proteína A de *Staphylococcus aureus*, **ProtA** (Sigma-Aldrich)

Proteína G recombinante de *Escherichia coli*, **ProtG** (≥ 90 %, Sigma-Aldrich)

Sal de sodio de la *N*-hidroxisulfosuccinimida, **Sulfo-NHS** (≥ 98 %, Sigma-Aldrich)

Tetracloroaurato (III) de hidrógeno trihidratado, **HAuCl₄** (≥ 99.9 %, Sigma-Aldrich)

3.2.4 Micropartículas ferromagnéticas

Partículas magnéticas modificadas con proteína A, **ProtA-MBs** (30 mg mL⁻¹, Dynabeads® Protein A, Invitrogen Dynal AS).

Partículas magnéticas modificadas con proteína G, **ProtG-MBs** (30 mg mL⁻¹, Dynabeads® Protein G, Invitrogen Dynal AS).

Partículas magnéticas para aislamiento de proteínas modificadas con un *tag* de histidinas, **HisTag-MBs** (40 mg mL⁻¹, Dynabeads® His-Tag Isolation & Pulldown, Life Technologies AS).

3.2.5 Inmunorreactivos y trazadores enzimáticos

Anticuerpo policlonal de conejo anti-peroxidasa de rábano, **antiHRP** (antisuero liofilizado, Sigma-Aldrich).

Anticuerpo policlonal de conejo anti-sulfapiridina, **antiSPY** (producido por un Grupo de Investigación colaborador, ver *Apartado 3.4.1*).

Anticuerpo policlonal de oveja anti-tetraciclina, **antiTC** (fracción IgG, 9.98 mg mL⁻¹, inmunógeno: tetraciclina(amida)-BSA, Abcam).

Trazador enzimático para β -lactamas: penicilina conjugada con HRP, **PENG-HRP** (US Biological).

Trazador enzimático para sulfonamidas: sulfapiridina conjugada con HRP, **SPY-HRP** (producido por un Grupo de Investigación colaborador, ver *Apartado 3.4.1*).

Trazador enzimático para tetraciclinas, **TC-HRP**: tetraciclina conjugada con HRP (Abiox) y tetraciclina(amida) conjugada con HRP (US Biological).

3.2.6 Muestras y materiales de referencia analizados

Las muestras de leche de vaca UHT (entera, semidesnatada y desnatada) y de leche pasteurizada fueron adquiridas en un supermercado local.

Las muestras de leche cruda fueron obtenidas en una granja lechera local, tras el ordeño de vacas lecheras.

Leche semidesnatada liofilizada con un contenido certificado de OTC de $(101 \pm 11) \mu\text{g kg}^{-1}$, **ERM®-BB492** (LGC Standards).

Leche semidesnatada liofilizada con un contenido certificado de OTC $< 5 \mu\text{g kg}^{-1}$, **ERM®-BB493** (LGC Standards).

3.2.7 Otros reactivos empleados

En la síntesis del LAU-NTA

4-(Dimetilamino)piridina, **DMAP** ($\geq 99 \%$, Sigma-Aldrich)

Cloruro de lauroilo (98 %, Sigma-Aldrich)

Éter etílico ($\geq 99.0 \%$, Sigma-Aldrich)

Hidrato de N_{α},N_{α} -bis(carboximetil)-L-lisina, **ANTA** ($\geq 97.0 \%$, Sigma-Aldrich)

N,N -Dimetilformamida, **DMF** (99.8 %, Sigma-Aldrich)

Piridina (99.8 %, Sigma-Aldrich)

En la hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos

Hidróxido de potasio, **KOH** (90 %, Scharlau)

Metanol, **MeOH** (99.98 %, Scharlau)

En la determinación de la concentración de proteínas

Reactivo colorante para el ensayo de proteínas, **Reactivo de Bradford** (Bio-Rad)

En la fabricación de las células de biocombustible

2,2'-(Etilendioxi)dietanol (Sigma-Aldrich)

Celobiosa deshidrogenasa recombinante de *Myrococcum thermophilum*, **CDH**, con una actividad medida con 2,6-dicloroindofenol como aceptor electrónico, de 46.39 U mL⁻¹, proporcionada por el Prof. Dr. Roland Ludwig (Department of Food Sciences and Technology, BOKU-University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Viena).

Polímero redox funcionalizado con azul de toluidina, **P017-TB**, sintetizado según se ha descrito en [Al-Jawadi, 2012].

Otros

Cloruro de calcio dihidratado, **CaCl₂·2H₂O** (min. 99 %, Merck)

Peroxidasa de rábano, **HRP** (Tipo II, 167 U por mg de proteína, Sigma-Aldrich)

3.3 Preparación de disoluciones

Para la preparación de todas las disoluciones empleadas, se ha utilizado agua desionizada obtenida mediante un sistema de purificación Millipore Milli-Q (18 M Ω cm a 25 °C).

3.3.1 Disoluciones reguladoras

Disolución reguladora *Binding and Washing* (B&W) 50 mM (pH 8.0): se prepara una disolución reguladora de fosfato 50 mM, conteniendo cloruro de sodio 0.3 M y Tween®20 al 0.01 % (v/v).

Disolución reguladora *Pull and Down* (P&D) 3.25 mM (pH 7.4): se prepara una disolución reguladora de fosfato 3.25 mM, conteniendo cloruro de sodio 70 mM y Tween®20 al 0.01 % (v/v).

Disolución reguladora de acetato de sodio 0.1 M (pH 4.5): se prepara por dilución de la disolución reguladora comercial, ajustándose el pH con HCl 1.0 M.

Disolución reguladora de carbonato 50 mM (pH 9.6): se disuelven 80 mg de Na₂CO₃ y 146 mg de NaHCO₃ en 50 mL de agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.

Disolución reguladora de citrato 0.1 M (pH 4.0): se disuelven 17.0 mL de citrato de sodio 0.2 M y 33.0 mL de ácido cítrico 0.2 M en 50 mL de agua desionizada.

Disolución reguladora de MES 50 mM (pH 6.0): se disuelven 244 mg de MES en 25 mL de agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.

Disolución reguladora de fosfato 1.0 M: se disuelven 8.4 g de Na₂HPO₄ y 112.9 g de NaH₂PO₄ en 1.0 L de agua desionizada.

Disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.0): se prepara por dilución de la anterior disolución, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.

Disolución reguladora de fosfato 50 mM (pH 6.0): se prepara por dilución de la disolución reguladora de fosfato 1.0 M, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.

Disolución reguladora PBS 10 mM (pH 7.5): se prepara una disolución reguladora de fosfato 10 mM conteniendo NaCl 138 mM y KCl 2.7 mM.

Disolución reguladora de fosfato salino y Tween®20 (PBST) 10 mM (pH 7.5): se prepara una disolución de PBS 10 mM, conteniendo Tween®20 al 0.05 % (v/v).

Disolución de Tween®20 al 5 % (v/v): se disuelven 2.5 mL de Tween®20 en 50 mL de agua desionizada.

3.3.2 Disoluciones empleadas en las medidas electroquímicas

Disolución de HQ 200 mM: se disuelven 22.0 mg de HQ en 1.0 mL de disolución reguladora de fosfato 50 mM.

Disolución de $K_4Fe(CN)_6$ 5 mM/KCl 100 mM: se disuelven 21.2 mg de $K_4Fe(CN)_6$ y 74.6 mg de KCl en 10.0 mL de agua desionizada.

Disolución de $K_3Fe(CN)_6$ / $K_4Fe(CN)_6$ (5 mM cada uno): se disuelven 16.5 mg de $K_3Fe(CN)_6$ y 21.2 mg de $K_4Fe(CN)_6$ en 10.0 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 7.0.

Disolución de peróxido de hidrógeno 0.1 M: se diluyen 51 μ L de la disolución comercial al 30 % (p/v) en 5.0 mL de disolución reguladora de fosfato 50 mM.

Disolución de $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ 5 mM/KCl 100 mM: se disuelven 77.4 mg de $Ru(NH_3)_6Cl_3$ y 372.8 mg de KCl en 50 mL de agua desionizada.

3.3.3 Disoluciones empleadas en la modificación de superficies electródicas

Disolución de $AuCl_4^-$ 0.1 mM: se disuelven 1.0 mg de $HAuCl_4$ en 25 mL de H_2SO_4 0.5 M.

Disolución para la modificación con radicales amino del 4-ABA: se disuelven 4.2 mg de 4-ABA y 106.4 mg de $LiClO_4$ en 10 mL de EtOH absoluto.

Disolución para la modificación de electrodos de oro con una monocapa autoensamblada de HS-NTA: se disuelven 4.8 mg de HS-NTA en 1.0 mL de EtOH.

3.3.4 Otras disoluciones

Disolución de BSA al 2 % (p/v): se disuelven 50 mg de BSA en 2.5 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M, pH 7.0.

Disolución de caseína al 5 % (p/v): se disuelven 125 mg de caseína en 2.5 mL de NaOH 0.1 M.

Disolución de NaOH 2.0 M: Se disuelven 8.0 g del compuesto en 100 mL de agua desionizada.

Disolución de HRP 8.0 U mL⁻¹ (48 μ g mL⁻¹): se disuelven 2.4 mg de HRP en 1.0 mL de PBS, obteniéndose así una dilución intermedia de 2.4 mg mL⁻¹; 15 μ L de esta disolución se llevan a 750 μ L de PBS para obtener la dilución final.

Disolución para la deposición enzimática de nanopartículas de plata: se disuelven 2.5 mg de HQ, 1.0 mg de $AgNO_3$ y 2.0 μ L de la disolución comercial de H_2O_2 al 30 % (p/v) en 1.0 mL de disolución reguladora de citrato 0.1 M (pH 4.0).

3.4 Procedimientos experimentales

3.4.1 Preparación de los inmunorreactivos empleados en la determinación de sulfonamidas

La preparación del antisuero policlonal **As167** fue realizada por el grupo de investigación de la Prof. M.-Pilar Marco, en el *Nanobiotechnology for Diagnostics (Nb4D) group*, IQAC-CSIC, CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, en Barcelona, España, de acuerdo con el protocolo descrito en [Adrian, 2009^a]. Este protocolo consistió en la inmunización de tres hembras de conejos blancos de Nueva Zelanda con el hapteno **SA1** unido covalentemente a hemocianina de cangrejo herradura como proteína portadora (ver **Figura 3.1**).

El antisuero obtenido fue purificado por precipitación con sulfato de amonio, para ello se adicionó por goteo una disolución saturada de sulfato de amonio a 1.8 mL del suero en baño de hielo, hasta obtener una disolución saturada al 35 %. Después de 4 h bajo agitación constante a 4 °C, se separaron los anticuerpos precipitados del sobrenadante mediante centrifugación (10 min a 10 000 rpm). El precipitado se resuspendió en 0.9 mL de PBS, se dializó cuatro veces frente a 5 L de PBS 0.5 mM y una vez frente a 5 L de agua desionizada y se liofilizó, almacenándose a -40 °C hasta su utilización. Para su uso, el sólido liofilizado se disolvió en la cantidad requerida de PBS para obtener una disolución de 1.0 mg mL⁻¹ y se almacenó a 4 °C.

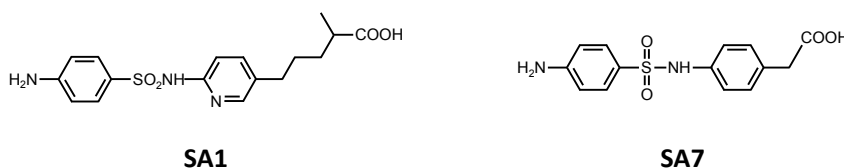


Figura 3.1. Estructuras del hapteno de inmunización SA1 y del hapteno empleado para la preparación del trazador enzimático SA7.

El trazador enzimático **SA7-HRP** se preparó mediante enlace covalente del hapteno **SA7** (ver **Figura 3.1**) a peroxidasa de rábano (HRP), previa activación de los grupos carboxilo mediante el método de los ésteres activos con carbodiimida y *N*-hidroxisuccinimida, de acuerdo al protocolo descrito en [Font, 2008].

3.4.2 Producción, hiperexpresión y purificación de la PBP

Los procedimientos referentes a la obtención y purificación de la proteína fijadora de penicilina (PBP) fueron realizados por el grupo de investigación de la Prof. Rosario Muñoz, en el Laboratorio de Biotecnología Bacteriana del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición del CSIC en Madrid, España. Los protocolos seguidos se describen a continuación:

El gen *pbpX* de *Streptococcus pneumoniae* R6 que codifica la proteína fijadora de penicilina 2X, se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando los iniciadores 699 (5'-GGTGAACCTGTATTTCCAGGGC**atggggacaggcactcgc**) y 700 (5'-ATCGATAAGCTTAGTTAGCTATT**Agtctcctaaagttaatgtaattttt**), los nucleótidos correspondientes a la secuencia

del gen *pbpX* se indican con letras minúsculas, mientras que los codones de inicio y fin se indican en negrita. El gen *pbpX* se amplificó, omitiendo 48 residuos de aminoácidos de un pequeño péptido hidrófobo en el extremo *N*-terminal implicado en el enlace a membrana. El producto purificado por PCR de 2.1 kb se insertó en el vector pURI3-TEV-Km. El vector pURI3-TEV-Km se construyó previamente a partir del vector pURI3-TEV siguiendo la misma estrategia usada para clonar cualquier gen en vectores pURI. El gen de resistencia a kanamicina (*aph*), de 813 pares de bases, se amplificó a partir del vector pET28a usando los oligonucleótidos 755 (5'-CAATAATATTGAAAAAGGAAGAG**Tat**gagccatattcaacgggaaacgt) y 756 (5'-ATGAGTAACTTGGTCTG**ACA**ttagaaaaactcatcgagcatcaaagt), los nucleótidos correspondientes a la secuencia del gen *aph* se indican con letras minúsculas, mientras que los codones de inicio y fin se indican en negrita. Después de la amplificación, el fragmento de 813 pares de bases se usó para sustituir el gen de resistencia a ampicilina presente en el vector pURI3-TEV.

El vector de expresión pURI3-TEV-Km presentó la secuencia MGGSHHHHHHGENLYFQG, consistente en una metionina *N*-terminal seguida de tres aminoácidos espaciadores, un *tag* de seis histidinas (His₆), un residuo espaciador de glicina y el sitio de reconocimiento de proteasa TEV. Así, la proteína recombinante PBP2X marcada con His₆ consistió en 720 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 78 kDa. Se aislaron plásmidos recombinantes conteniendo la inserción (pURI3-TEV-Km-PBP2X) a partir de células transformadas de *E. coli* DH10B. A continuación se transformó el pURI3-TEV-Km-PBP2X en células de *E. coli* BL21 competentes para la expresión de la proteína PBP2X, empleando kanamicina como marcador de selección.

Se incubaron células portando el plásmido pURI3-TEV-Km-PBP2X a 37 °C en medio LB conteniendo 200 µg mL⁻¹ de kanamicina, hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.4 a 600 nm y se indujeron mediante la adición de IPTG en concentración final 0.4 mM. Después de la inducción, se incubaron las células para su crecimiento a 22 °C durante 20 h y se recolectaron por centrifugación. Las células se resuspendieron en disolución reguladora de fosfato 50 mM (pH 7.0) conteniendo NaCl 300 mM. El extracto se obtuvo por lisis de la suspensión celular mediante prensa Francesa (tres veces a 1100 psi). La fracción insoluble del lisado se eliminó por centrifugación a 47 000×*g* durante 30 min a 4 °C y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de tamaño de poro medio de 0.45 µm.

La PBP se purificó mediante cromatografía de afinidad metal-ligando (IMAC), para ello después de la filtración, el sobrenadante se mezcló con agitación suave a temperatura ambiente durante 20 min con 1 mL de una resina de cobalto (TALON®), equilibrada con una disolución reguladora de fosfato 50 mM (pH 7.0) conteniendo NaCl 300 mM e imidazol 10 mM, con objeto de mejorar la especificidad de la interacción en la cromatografía por afinidad. La enzima enlazada se eluyó usando la misma disolución reguladora, pero conteniendo imidazol 150 mM. Se verificó la pureza de la proteína durante las diferentes etapas del proceso de purificación, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico al 8 % (SDS-PAGE) (ver **Figura 3.2**). La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford [Bradford, 1976].

La proteína purificada se almacenó en el medio de elución conteniendo 10 % de glicerol acuoso a -20 °C.

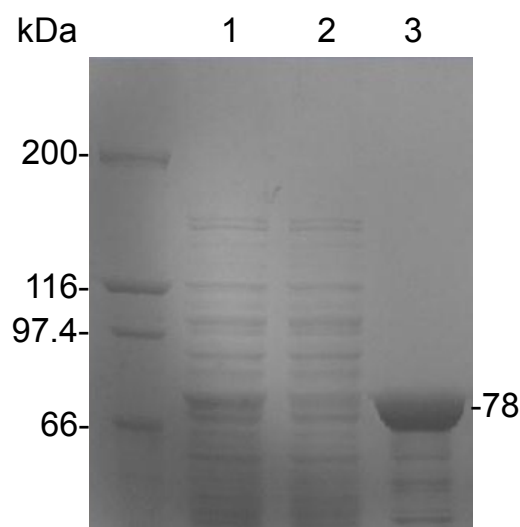


Figura 3.2. Análisis de los procesos de producción, inmovilización y purificación de la PBP mediante SDS-PAGE. Carriles: **1)** extracto soluble de células de *E. coli* BL21 portadoras del vector pURI3-TEV-Km; **2)** extracto soluble de células de *E. coli* BL21 portadoras del plásmido recombinante pURI3-TEV-Km-PBP2X; **3)** His-PBP purificada por IMAC y eluida con imidazol 150 mM. Se indican los pesos moleculares de las proteínas marcadoras (a la izquierda) y de la proteína recombinante (a la derecha).

3.4.3 Síntesis del lauroilo-NTA

La síntesis de la N^2,N^2 -bis(carboximetil)- N^6 -dodecanoil lisina (**LAU-NTA**) fue realizada por la Prof. Paloma Martínez, en el Departamento de Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid. El protocolo empleado consistió en la adición sucesiva de 93 mg (0.76 mmol) de DMAP y 243 μ L (3.05 mmol) de piridina a una suspensión de 200 mg (0.76 mmol) de ANTA en 5 mL de DMF, bajo agitación vigorosa a temperatura ambiente. Después de 10 min se adicionaron 220 μ L (0.92 mmol) de cloruro de lauroilo y se agitó la mezcla durante 2 días a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó a vacío y el producto obtenido se disolvió en 2 mL de agua. A continuación se llevó a cabo una acidificación con HCl 1.0 M y el precipitado resultante se filtró y se lavó con éter etílico, obteniéndose así el producto final, con un rendimiento del 56 %.

3.4.4 Modificación de las superficies electródicas de carbono

Activación a intensidad de corriente constante

La activación cronopotenciométrica de las superficies electródicas se realizó de acuerdo a los protocolos descritos en [Hernández-Santos, 2004] y [Díaz-González, 2005], para lo que se depositaron 50 μ L de H_2SO_4 0.1 M sobre la superficie del electrodo y se aplicó una intensidad de corriente constante de 5 μ A durante 2 min. El electrodo así modificado se lavó con agua desionizada y se secó bajo corriente de N_2 .

Nanoestructuración con partículas de oro

Los electrodos serigrafiados de carbono se modificaron según el protocolo descrito en [Escamilla-Gómez, 2009]. Las nanopartículas de oro se formaron depositando 50 μ L de una

disolución de AuCl_4^- 0.1 mM sobre el electrodo de trabajo, se aplicó una corriente de $-100 \mu\text{A}$ durante 2 min y a continuación, un potencial de -0.1 V durante 2 min.

Generación de grupos aldehído

Para la generación de grupos $-\text{COH}$ sobre la superficie de carbono de los electrodos serigraviados se siguió el protocolo descrito en [Xu, 2010]. Se depositaron $50 \mu\text{L}$ de HNO_3 0.1 M sobre el electrodo, y se aplicó un potencial de 1.8 V durante 3 min, seguido de un potencial de -1.5 V durante 1 min. Por último se lavó el electrodo con agua desionizada y se secó bajo corriente de N_2 .

Modificación con sales de diazonio del 4-ABA

Para la modificación de los electrodos serigraviados de carbono con sales de diazonio del ácido 4-aminobenzoico se siguieron tres protocolos diferentes descritos a continuación:

a) Protocolo adaptado de [Ho, 2010]:

Se disolvieron 2.0 mg (0.015 mmol) de 4-ABA en 0.2 mL de HCl_{cc} en baño de hielo ($0 - 5^\circ\text{C}$). A continuación se adicionaron gota a gota $38 \mu\text{L}$ de una disolución de NaNO_2 0.2 mM, manteniendo la disolución con agitación constante durante 5 min. A continuación, se depositaron $50 \mu\text{L}$ de la disolución resultante sobre el electrodo serigraviado y se realizaron 10 barridos voltamperométricos entre 0.0 y -1.0 V a 0.2 V s^{-1} . Después de esto se lavó el electrodo con agua desionizada y MeOH. Finalmente, se secó el electrodo modificado bajo corriente de N_2 .

b) Protocolo adaptado de [Dequaire, 1999]:

Se disolvieron 2.0 mg (0.015 mmol) de 4-ABA en 0.2 mL de HCl 0.1 M en baño de hielo ($0-5^\circ\text{C}$) y se adicionaron 40.2 mg ($\sim 0.6 \text{ mmol}$) de NaNO_2 , manteniendo la disolución bajo agitación constante durante 5 min. La disolución obtenida se diluyó adicionando 0.6 mL de HCl 0.1 M. Se depositaron $50 \mu\text{L}$ de esta disolución sobre el electrodo serigraviado y se aplicó un potencial de -0.25 V durante 1 min. Finalmente se lavó el electrodo con agua desionizada y se secó bajo corriente de N_2 .

c) Protocolo adaptado de [Liu, 2008]:

Se disolvieron 40 mg (0.29 mmol) de 4-ABA en 0.2 mL de H_2SO_4 7 M en baño de hielo. A continuación se adicionó gota a gota una disolución de NaNO_2 al 85 % (p/v), monitorizando la reacción mediante el cambio de coloración. Se transfirieron $50 \mu\text{L}$ de esta disolución a la superficie del electrodo serigraviado y se hicieron cuatro barridos voltamperométricos entre 0.2 y -0.4 V a 100 mV s^{-1} . Tras lo cual, se lavó el electrodo con agua desionizada y se secó bajo corriente de N_2 .

Funcionalización con radicales amino del 4-ABA

Para la modificación de las superficies electródicas de carbono con el ácido 4-aminobenzoico se siguió un procedimiento adaptado de [Liu, 2000], consistente en la modificación electroquímica de los electrodos serigraviados de carbono mediante su inmersión en una disolución de 4-ABA 3 mM y LiClO_4 0.1 M en EtOH absoluto, realizando tres barridos voltamperométricos entre 0.0 y 1.0 V (frente al electrodo de pseudoreferencia de Ag del SPCE) a

10 mV s⁻¹. Tras esto, el electrodo se aclaró con agua desionizada y se secó bajo corriente de N₂, empleándose para su posterior modificación o almacenándose a temperatura ambiente hasta su uso.

Para la inmovilización covalente de proteínas sobre las superficies electródicas así modificadas, se activaron los grupos –COOH del 4-ABA mediante el método de los ésteres activos, depositando sobre el electrodo de trabajo 5 µL de una disolución de EDC y Sulfo-NHS (100 mM cada uno) en disolución reguladora MES pH 6.0, dejando reaccionar en atmósfera húmeda, a temperatura ambiente durante 30 min. Una vez realizada la activación, el electrodo se aclaró con la disolución reguladora de MES y se secó bajo una corriente de N₂. A continuación se realizó la inmovilización de la proteína, depositando una alícuota de 5 µL de una disolución de la proteína empleada y procediendo a su incubación.

Funcionalización con derivados alquílicos del NTA

La funcionalización de los electrodos serigrafiados con derivados alquílicos del NTA de cadena larga, por adsorción de las cadenas alquílicas sobre superficies de carbono, se realizó depositando en la superficie del electrodo de trabajo una alícuota de 5 µL de una disolución de HS-NTA 1.0 mM o LAU-NTA 3.0 mM en disolución reguladora de carbonato (pH 9.6) e incubando durante 2.5 h en atmósfera húmeda y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los electrodos se lavaron con agua desionizada y se secaron bajo corriente de N₂.

Los SPCEs así modificados se incubaron con 5 µL de una disolución de CoCl₂ 7.5 mM en disolución reguladora de acetato (pH 4.5) durante 30 min. A continuación los electrodos se lavaron con agua desionizada y se secaron bajo corriente de N₂.

3.4.5 Fabricación de los biosensores integrados

Los electrodos serigrafiados presentan diversas ventajas en comparación a los electrodos tradicionales habitualmente empleados en el desarrollo de biosensores. El proceso de fabricación mediante la tecnología *screen-printing* permite la producción en masa, por lo que el coste individual de cada electrodo es relativamente bajo [Renedo, 2007], pudiendo ser desechados tras su uso, con lo que se consigue mantener un elevado grado de reproducibilidad en las medidas realizadas con los sensores desarrollados a partir de los mismos. Entre los diferentes materiales empleados para la fabricación de electrodos serigrafiados, los materiales de carbono permiten amplias ventajas al ser empleados como transductores en la fabricación de biosensores electroquímicos, ya que presentan una amplia ventana de potencial, bajas corrientes de fondo, bajo coste, son químicamente inertes, y permiten diversas modificaciones debido a su rica química superficial [Fanjul-Bolado, 2008], por lo que se eligieron como elementos transductores para los biosensores desarrollados.

Inmovilización covalente de anticuerpos sobre electrodos serigrafiados de carbono

Sobre SPCEs previamente modificados con radicales amino del 4-ABA y activados mediante el método de los ésteres activos con EDC y Sulfo-NHS, se depositaron 5 µL de una disolución de antiSPY de aproximadamente 300 µg mL⁻¹ en PBST, incubando a temperatura ambiente y en atmósfera húmeda durante 90 min. Tras este período, se lavó el electrodo con

PBST, con objeto de eliminar los anticuerpos no enlazados y se secó bajo corriente de N_2 . Los inmunosensores así preparados se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

Inmovilización orientada de anticuerpos sobre electrodos serigrafiados de carbono

Sobre SPCEs previamente modificados con radicales amino del 4-ABA y activados mediante el método de los ésteres activos con EDC y Sulfo-NHS, se depositaron 5 μ L de una disolución de ProtG de 10 μ g mL⁻¹ en PBST, incubando a temperatura ambiente y en atmósfera húmeda durante 20 min. Los electrodos se lavaron entonces con PBST, con objeto de eliminar las proteínas no enlazadas y se secaron bajo corriente de N_2 . Posteriormente, se depositaron 5 μ L de una disolución del anticuerpo de captura de una concentración aproximada de 300 μ g mL⁻¹ en PBST, incubando a temperatura ambiente en atmósfera húmeda durante 90 min. Transcurrido este tiempo se lavaron los electrodos con PBST para eliminar los anticuerpos no enlazados a la proteína bacteriana y se secaron bajo corriente de N_2 . Los inmunosensores se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

Inmovilización de la PBP sobre electrodos de carbono

La proteína fijadora de penicilina recombinante se inmovilizó sobre electrodos serigrafiados de carbono modificados con NTA-Co²⁺ a través del residuo de histidinas con el que fue hiperexpresada. Para ello se depositó una alícuota de 5 μ L de una disolución de PBP de 880 μ g mL⁻¹ sobre la superficie modificada de los electrodos y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. A continuación los SPCEs se lavaron con PBST para eliminar los restos de proteína no inmovilizada y se secaron bajo corriente de N_2 .

3.4.6 Modificación de las partículas magnéticas

Magnetosensores para sulfonamidas y tetraciclinas

Para la modificación de las partículas magnéticas empleadas en los magnetosensores desarrollados para la determinación de sulfonamidas y tetraciclinas se siguió el siguiente protocolo:

Se tomó una alícuota de 5.0 μ L de las ProtG-MBs comerciales y se transfirió a un tubo de plástico de 1.5 mL. Se realizaron dos lavados con 100 μ L de PBS, consistiendo cada lavado en una resuspensión de las partículas magnéticas en la disolución de PBS, seguida de la extracción del sobrenadante con ayuda de separación magnética, posicionando el tubo de plástico en un concentrador magnético, como se observa en la **Figura 3.3**. El objetivo de estos lavados previos a la modificación es eliminar la azida sódica empleada como preservador en la suspensión comercial de partículas magnéticas, debido a que este compuesto inactiva a la enzima HRP [Ortiz de Montellano, 1988]. A continuación se resuspendieron las MBs en 50 μ L de una disolución de antiSPY 50 μ g mL⁻¹ o antiTC 50 μ g mL⁻¹ en PBS y se incubaron bajo agitación constante (600 rpm) a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, tras colocar el tubo de plástico en el concentrador magnético, se eliminó el sobrenadante y se lavaron las MBs dos veces con 100 μ L de PBST, con la finalidad de eliminar los anticuerpos no enlazados a las ProtG-MBs. Las

partículas así modificadas se utilizaron para la determinación de antibióticos o se resuspendieron en 50 μL de PBS, almacenándose a 4 °C hasta su utilización.

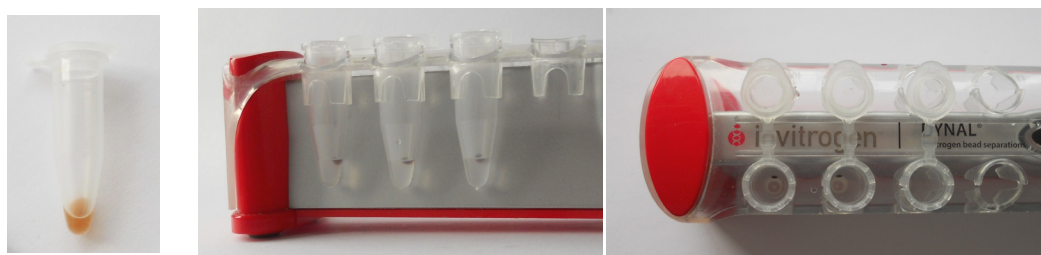


Figura 3.3. Separación magnética de las micropartículas modificadas empleadas para la fabricación de magnetosensores. En la parte izquierda se observa una suspensión de partículas magnéticas. En las siguientes figuras se muestra la separación de las MBs del sobrenadante al colocar los tubos de plástico en el concentrador magnético.

Magnetosensor para antibióticos β -lactámicos

Para la modificación de las partículas magnéticas empleadas en el magnetosensor desarrollado para la determinación de antibióticos β -lactámicos se siguió el siguiente protocolo:

Se tomó una alícuota de 3.0 μL de las HisTag-MBs comerciales y se transfirió a un tubo de plástico de 1.5 mL. Se realizaron dos lavados con 100 μL de B&W y a continuación se resuspendieron las MBs en 100 μL de una disolución de PBP 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en B&W, incubando bajo agitación constante (600 rpm) a 25 °C durante 10 min. Posteriormente se eliminó el sobrenadante mediante separación magnética y se lavaron las partículas dos veces con 200 μL de B&W, eliminando así los restos de PBP no inmovilizada. Las MBs así modificadas se utilizaron para la determinación de antibióticos β -lactámicos o se resuspendieron en 100 μL de B&W (pH 8.0) y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

Magnetosensor para la detección multiplexada de cefalosporinas, sulfonamidas y tetraciclinas

Para la preparación de este magnetosensor se emplearon tres tipos diferentes de partículas magnéticas modificadas, dos lotes de MBs se modificaron con anticuerpos de captura selectivos (MBs-antiTC y MBs-antiSPY), mientras que un tercero se modificó con la proteína de afinidad recombinante (MBs-PBP).

a) Las MBs-antiTC y MBs-antiSPY se prepararon de la misma manera; para la preparación de los lotes de cada una de ellas se siguió el siguiente protocolo:

Se tomó una alícuota de 1.0 μL de las ProtG-MBs comerciales y se transfirió a un tubo de plástico de 1.5 mL. Las partículas se lavaron dos veces con 100 μL de PBS, siguiendo el procedimiento de separación magnética descrito previamente. A continuación, las MBs se resuspendieron en 50 μL de una disolución 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anticuerpo de captura (antiTC o antiSPY) en PBS y se incubaron durante 30 min a 37 °C, bajo agitación constante a 600 rpm. Posteriormente se eliminó el sobrenadante mediante separación magnética y las partículas magnéticas modificadas se lavaron dos veces con PBST.

b) Para la preparación de las MBs-PBP:

Se tomaron 2.0 μL de las HisTag-MBs comerciales y se transfirieron a un tubo de plástico de 1.5 mL. Las MBs se lavaron dos veces con 100 μL de B&W, tras esto, las partículas se resuspendieron en 25 μL de una disolución de PBP 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en B&W. Tras su incubación durante 10 min a 25 °C bajo agitación constante a 600 rpm, se eliminó el sobrenadante mediante separación magnética y se lavaron las partículas con 100 μL de B&W.

Los tres lotes de partículas magnéticas modificadas se resuspendieron en disolución reguladora de fosfato 50 mM (pH 6.0), se mezclaron y se usaron para la detección de antibióticos o se almacenaron a 4 °C en PBS filtrado hasta su uso.

3.4.7 Protocolos de los ensayos de afinidad

Inmunoensayos para la determinación de sulfonamidas y tetraciclinas con los sensores integrados

En el caso de ser necesaria una etapa previa de bloqueo de la superficie electródica, esta se llevó a cabo depositando 50 μL de una disolución de caseína 0.2 % (p/v) en PBST (preparada por dilución de la disolución de caseína al 5 %) sobre el SPCE, dejando incubar en atmósfera húmeda durante 10 min.

Sobre el electrodo modificado con los anticuerpos de captura se depositó una alícuota de una disolución de la muestra o patrón a analizar en presencia del trazador enzimático empleado para el ensayo competitivo. Para ello, la disolución de leche (muestra o patrón) se diluyó con el mismo volumen de una disolución de PBST conteniendo la concentración optimizada de trazador enzimático, una alícuota de 50 μL de esta disolución se depositó sobre la superficie del inmunosensor, y se incubó a temperatura ambiente durante un tiempo determinado. Después de esto, el electrodo se lavó con PBST y se procedió a la medida electroquímica para evaluar la extensión de la reacción inmunológica.

Ensayo de afinidad para la determinación de antibióticos β -lactámicos con el biosensor integrado

Se prepararon disoluciones de P&D (conteniendo NaCl 1.0 M) o de leche diluida con P&D conteniendo la concentración optimizada de trazador enzimático y el contenido deseado de antibiótico y se homogenizaron mediante agitación en un vórtex. Para realizar el ensayo competitivo, se depositó una alícuota de 50 μL de esta disolución sobre la superficie del sensor, y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Después de esto, el electrodo se lavó con PBST y se realizó la medida electroquímica correspondiente.

Inmunoensayos para la determinación de sulfonamidas y tetraciclinas con los magnetosensores

El protocolo del inmunoensayo seguido tanto para la determinación de sulfonamidas, como de tetraciclinas consistió en el siguiente procedimiento:

Se prepararon disoluciones de PBST o de leche diluida con PBST (dilución 1:1) conteniendo la concentración optimizada de trazador enzimático (SPY-HRP o TC-HRP) y el contenido deseado de antibiótico y se homogenizaron mediante agitación en un vórtex. Las MBs modificadas con los anticuerpos de captura, descritas en el *Apartado 3.4.6*, se resuspendieron en 50 μL de las disoluciones anteriormente descritas y se incubaron con agitación constante (600 rpm) a 37 °C durante 30 min. A continuación se colocó el tubo de plástico en el concentrador magnético y se eliminó el sobrenadante. Por último, las partículas se lavaron dos veces con 100 μL de PBST y se resuspendieron en 50 μL de disolución reguladora de fosfato 50 mM (pH 6.0).

Ensayo de afinidad para la determinación de antibióticos β -lactámicos con el magnetosensor

Se prepararon disoluciones de P&D o de leche diluida con P&D (dilución 1:1) conteniendo la concentración optimizada de trazador enzimático (PENG-HRP) y el contenido deseado de antibiótico y se homogenizaron mediante agitación en un vórtex. Las MBs modificadas con la PBP, descritas en el *Apartado 3.4.6*, se resuspendieron en 100 μL de las disoluciones descritas anteriormente y se incubaron a 25 °C, bajo agitación constante a 600 rpm durante 30 min. A continuación se colocó el tubo de plástico en el concentrador magnético, se eliminó el sobrenadante y se lavaron las partículas tres veces con 100 μL de P&D. Por último, las MBs se resuspendieron en 50 μL de disolución reguladora de fosfato 50 mM (pH 6.0).

Ensayo de afinidad para la detección multiplexada de cefalosporinas, sulfonamidas y tetraciclinas con el magnetosensor

Las disoluciones de muestras de leche a analizar fueron diluidas 1:1 con PBST, conteniendo la concentración optimizada de trazadores enzimáticos y el contenido deseado de antibiótico y se homogenizaron mediante agitación en un vórtex. La mezcla de MBs modificadas con los receptores selectivos para cada familia de antibióticos, descritas en el *Apartado 3.4.6*, se resuspendieron en 50 μL de la disolución anteriormente descrita y se incubaron durante 5 min a 25 °C y bajo agitación constante a 600 rpm. A continuación se colocó el tubo de plástico en el concentrador magnético, se eliminó el sobrenadante y se lavaron las partículas tres veces con 100 μL de PBST. Por último, las MBs se resuspendieron en 50 μL de disolución reguladora de fosfato 50 mM (pH 6.0).

3.4.8 Fabricación de los ultramicroelectrodos de fibra de carbono

Para la fabricación de cada electrodo, una fibra de carbono (\varnothing 7–8 μm , SGL Technik GmbH) se adhirió al final de un alambre de cobre empleando un cemento conductor de carbono (LEIT-C, Neubauer Chemikalien). Tras insertar este acoplamiento en un capilar de vidrio de borosilicato ($\varnothing_{\text{externo}}$ 1.5 mm, $\varnothing_{\text{interno}}$ 0.375 mm; Hilgenberg GmbH) que sirve de cuerpo del ultramicroelectrodo, se inmovilizó el alambre de cobre con ayuda de un elastómero de silicona (Sylgard®184), dejando curar a 190 °C durante 15 min. A continuación, aplicando un tratamiento

térmico se selló el tubo capilar alrededor de la fibra de carbono, dejando unos milímetros de la fibra fuera del capilar. La fibra de carbono se aisló empleando una pintura de electrodeposición catódica (EDP, ClearClad HSR401 de LVH Coatings), el polímero soluble se precipitó aplicando una corriente catódica constante a un potencial de 6 V durante 1 min, entre el electrodo de fibra de carbono y un contraelectrodo de platino en forma de aro. A continuación, se realizó el curado de la pintura introduciendo los electrodos así tratados en una estufa a 190 °C durante 30 min. Finalmente se cortó la fibra de carbono aislada, exponiendo parte de la misma y consiguiendo así un microelectrodo de fibra de carbono en forma de disco.

3.4.9 Preparación de las inmunoplateformas interrogadas por SECM

Como sustrato para la preparación de las inmunoplateformas se emplearon placas de carbono vitrificado (SIGRADUR® G, HTW Hochtemperatur-Werkstoffe) que se limpiaron mediante pulido mecánico con pasta de alúmina de diferentes tamaños de grano (1, 0.3 y 0.05 μm ; LECO Corporation) en una pulidora Forcipol 1V (Metkon). Posteriormente se lavaron con agua desionizada y EtOH en un baño de ultrasonidos.

La superficie de las placas de carbono vitrificado se modificó electroquímicamente con radicales amino del 4-ABA como ha sido descrito anteriormente (*Apartado 3.4.4*), sumergiendo la placa en una disolución de 4-ABA 3 mM y LiClO_4 0.1 M en EtOH absoluto y realizando tres barridos voltamperométricos entre 0.0 y 1.0 V (vs. Ag/AgCl) a 10 mV s^{-1} . Tras aclarar la placa con agua y secarla bajo corriente de aire, se activaron los grupos carboxilo del 4-ABA mediante el método de los ésteres activos, depositando sobre su superficie una alícuota de una disolución de EDC y NHS (100 mM cada uno) en agua desionizada, dejando reaccionar a temperatura ambiente durante 45 min. Una vez realizada la activación, se aclaró la placa con agua desionizada y se secó bajo corriente de aire. A continuación se depositó una disolución de ProtG 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en PBST sobre la superficie de la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Posteriormente se lavó la placa con PBST para eliminar los restos de proteína no enlazada, se secó y se depositó en su superficie una alícuota de antiSPY 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en PBST, incubando durante 90 min. Tras este tiempo la placa se lavó con PBST con objeto de eliminar los anticuerpos no enlazados y se secó bajo corriente de aire.

Los ensayos competitivos se realizaron incubando las placas así modificadas con alícuotas de trazador enzimático (SPY-HRP) o mezclas de competición (SPY/SPY-HRP) preparadas en leche diluida 1:1 con PBST. Para ello, se mezcló un volumen de la muestra de leche conteniendo el contenido deseado de SPY, con el mismo volumen de una concentración establecida de SPY-HRP en PBST, para obtener una concentración de 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de trazador enzimático en la disolución final. Las inmunoplateformas previamente preparadas se incubaron con alícuotas de 0.5 μL de estas disoluciones, a temperatura ambiente y bajo atmósfera húmeda durante 30 min, tras este tiempo las placas modificadas se lavaron con PBST y se secaron bajo corriente de aire.

3.4.10 Preparación de los electrodos empleados en la fabricación de células de biocombustible

En la fabricación de las células de biocombustible se empleó un biocátodo basado en el inmunosensor integrado descrito anteriormente para la determinación de sulfonamidas y un bioánodo capaz de emplear lactosa como combustible:

Biocátodo

Para la fabricación del biocátodo se emplearon electrodos de barra de grafito de 3 mm de diámetro. La superficie de los electrodos se pulió manualmente con papel de lija y se lavó con agua desionizada. Posteriormente fue modificada con 4-ABA mediante formación de radicales amino catiónicos. Para ello los electrodos se sumergieron en una disolución de 4-ABA 3 mM y LiClO_4 0.1 M en EtOH absoluto, se realizaron tres barridos voltamperométricos entre 0.0 y 1.0 V (vs. Ag/AgCl) a 10 mV s^{-1} . A continuación se modificaron uniendo covalentemente proteína G a su superficie, para lo que se activaron los grupos carboxilo del 4-ABA mediante el método de los ésteres activos, depositando sobre la superficie de los electrodos una alícuota de 5 μL de una disolución de EDC y NHS (100 mM cada uno) preparada en disolución reguladora MES (pH 6.0) y dejando reaccionar a temperatura ambiente durante 40 min. Una vez realizada la activación, los electrodos se aclararon con agua desionizada y se secaron bajo corriente de aire. A continuación se depositaron 5 μL de una disolución de ProtG $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ en PBST sobre la superficie activada de los electrodos y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Los electrodos se lavaron entonces con PBST para eliminar los restos de proteína no enlazada, se secaron y se depositó en su superficie una alícuota de 5 μL de antiSPY $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ en PBST, incubando durante 90 min. Se lavaron los electrodos con PBST para eliminar los anticuerpos no enlazados y se secaron bajo corriente de aire.

Para llevar a cabo el ensayo competitivo, los inmunosensores así preparados se incubaron sumergiéndolos en 200 μL de una disolución de leche conteniendo el analito (SPY) diluida 1:1 con PBST conteniendo una concentración establecida de trazador enzimático (SPY-HRP, $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min y se lavaron con PBST. Los biocátodos así preparados se emplearon en el montaje de la célula de biocombustible.

Bioánodo

En la fabricación del bioánodo se emplearon electrodos de grafito de 6 mm de diámetro. Para su preparación se depositó sobre la superficie de los electrodos una mezcla de 4 μL de una disolución del polímero P017-TB 10 mg mL^{-1} en metanol, 4 μL de la enzima celobiosa deshidrogenasa (CDH, 14.61 mg mL^{-1}) y 3 μL de 2,2'-(etilendioxi)dietanotiol al 1.25 % en agua, empleado como agente entrecruzante. Esta disolución se incubó en atmósfera seca durante aproximadamente 30 min, tras lo cual los electrodos modificados se lavaron con disolución reguladora de fosfato y se emplearon en la célula de biocombustible construida.

3.4.11 Medidas electroquímicas

Amperometría en disoluciones agitadas

Para realizar las medidas amperométricas con los magnetosensores desarrollados se transfirió la suspensión de MBs modificadas con los conjugados a la superficie de un electrodo serigrafiado de carbono, dispuesto sobre un soporte con un imán de neodimio para la captura de las MBs sobre el electrodo de trabajo del SPCE, como se muestra en la **Figura 3.4**. Este método de inmovilización de las partículas magnéticas permite una localización reproducible de las mismas sobre la superficie electródica, evitando variaciones en el espesor de la película de MBs y su esparcimiento sobre la superficie del electrodo entre diferentes medidas.

Los amperogramas en disoluciones agitadas se obtienen sumergiendo el electrodo serigrafiado modificado o el electrodo serigrafiado con las MBs capturadas en su superficie mediante atrapamiento magnético (**Figura 3.4c**), en una célula de medida con 10.0 mL de la disolución reguladora de fosfato (pH 6.0) conteniendo HQ 1 mM. La disolución se mantiene bajo agitación mecánica constante. Se aplica una diferencia de potencial de -0.2 V (vs. electrodo de pseudoreferencia de Ag) y se espera hasta alcanzar la estabilización de la corriente de fondo. A continuación se añaden 50 μ L de una disolución de H_2O_2 0.1 M y se registra la corriente hasta que se alcanza el estado estacionario. El valor de la intensidad de corriente medido corresponde a la diferencia entre la corriente alcanzada en el estado estacionario y la corriente de fondo.

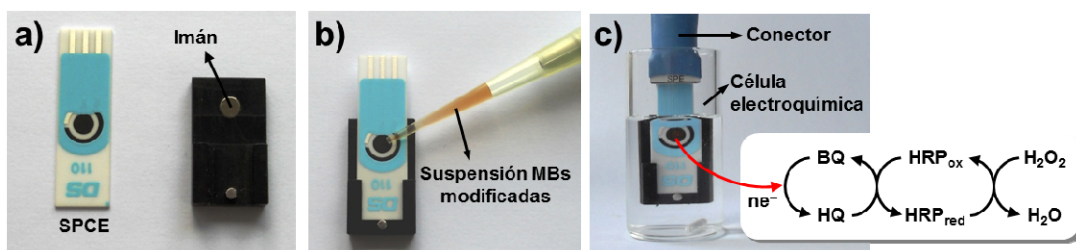


Figura 3.4. Soporte con imán de Nd empleado para la captura de MBs sobre la superficie de los SPCEs. **a)** Se muestra el imán ($\varnothing = 4$ mm) encastrado en el soporte y el electrodo serigrafiado de carbono. **b)** Deposición de la suspensión de MBs sobre el electrodo de trabajo del SPCE colocado en el soporte. **c)** Inmersión del electrodo serigrafiado, con las MBs en su superficie, en la célula de medida y cadena de reacciones que permite la medida amperométrica.

Voltamperometría cíclica (CV)

Para la obtención de las curvas intensidad-potencial se depositó sobre la superficie electródica una alícuota de la disolución $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mM cada uno), realizando un barrido entre los potenciales seleccionados a la velocidad de barrido elegida.

Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)

Las medidas de EIS se realizaron después de depositar sobre la superficie electródica una alícuota de la disolución $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mM cada uno). Estas medidas se realizaron al potencial de equilibrio (correspondiente a paso de corriente cero) del par $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, con una amplitud de excitación sinusoidal $V_{\text{rms}} = 10$ mV. Las medidas se llevaron a cabo cinco veces a cada frecuencia y se promediaron durante el barrido. La impedancia se midió en el intervalo apropiado de frecuencias a 20 pasos por década.

Microscopía electroquímica de barrido (SECM)

Las curvas de aproximación y barridos superficiales en SECM se realizaron empleando un ultramicroelectrodo de fibra de carbono como electrodo de trabajo, un alambre de platino como contraelectrodo y un electrodo Ag/AgCl/KCl 3 M, como electrodo de referencia.

El montaje experimental para las medidas por SECM (**Figura 3.5**) incluyó tres tornillos micrométricos movidos por motores paso a paso (08360, Nanotec® Owis, Staufen) y motores piezoeléctricos (P-611, NanoCube®) para el posicionamiento de la sonda en las direcciones x - y - z , así como un potenciostato para el control del potencial y el registro de la intensidad de corriente, todo ello bajo control de un programa informático.

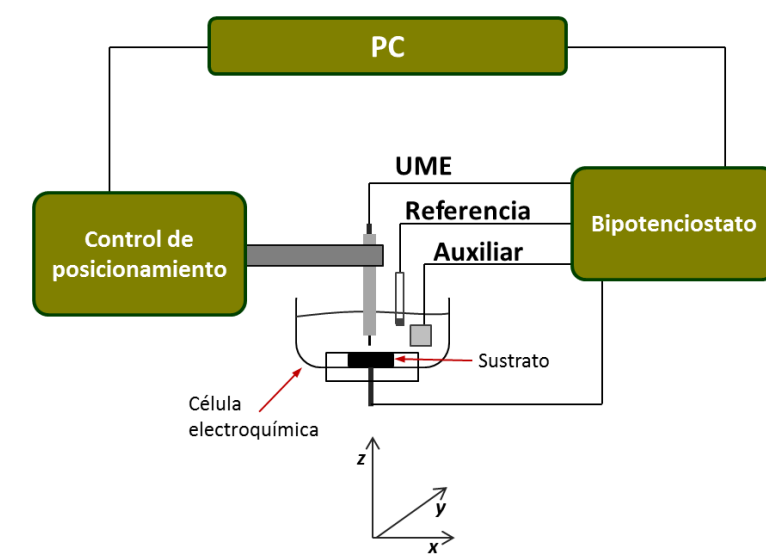


Figura 3.5. Representación del montaje empleado para las medidas por SECM.

Para el análisis de las inmunoplateformas preparadas de acuerdo al *Apartado 3.4.9*, se construyó una célula electroquímica según el esquema que se muestra en la **Figura 3.6**, en la que se introduce la disolución empleada como medio de trabajo para realizar las medidas tras sumergir los electrodos como se ilustra en la **Figura 3.5**.

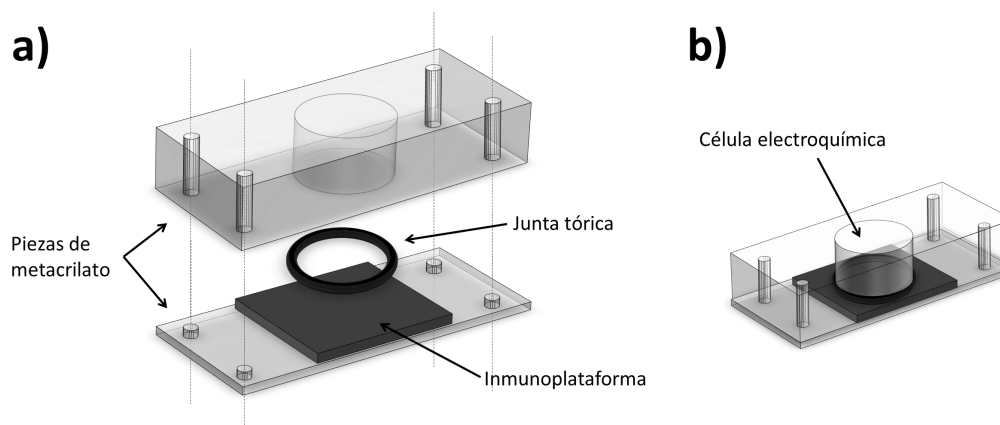


Figura 3.6. Célula electroquímica construida para las medidas por SECM. **a)** Componentes para la construcción de la misma; **b)** célula obtenida tras su ensamblaje.

Medidas realizadas con el prototipo de BFC

Los experimentos realizados con la BFC se llevaron a cabo en una célula de dos compartimentos. El compartimento del ánodo se llenó con 50 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0), conteniendo lactosa 140 mM. El compartimento del cátodo se llenó con 50 mL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0), conteniendo H_2O_2 1.0 mM y ABTS 0.25 mM. La dependencia de la densidad de potencia con el potencial de operación de las células de combustible construidas se obtuvo evaluando la respuesta amperométrica tras aplicar diferentes pulsos de potencial, comenzando al OCV obtenido para la BFC y disminuyendo el potencial en intervalos de 50 mV, hasta una diferencia de potencial final de 10 mV. Las intensidades de corriente obtenidas se midieron 10 min después de comenzar a aplicar cada diferencia de potencial, una vez que la corriente registrada fue estable [Haddad, 2012].

3.4.12 Desorción electroquímica en medio alcalino

Para la desorción electroquímica en medio alcalino en el estudio del recubrimiento de las superficies electródicas, se sumergieron los electrodos modificados en una disolución desoxigenada de NaOH 0.1 M y se realizaron tres barridos voltamperométricos sucesivos en la ventana de potencial comprendida entre 0.0 y -1.2 V (frente al electrodo de pseudoreferencia de plata) a 50 mV s^{-1} .

3.4.13 Hidrólisis de antibióticos β -lactámicos

Las disoluciones de antibióticos β -lactámicos hidrolizados se prepararon disolviendo 10 mg del antibiótico específico en 9.8 mL de metanol y 0.2 mL de hidróxido de potasio 1.0 M, dejando reaccionar toda la noche a 4°C .

3.4.14 Pretratamiento aplicado a las muestras de leche cruda

Las señales amperométricas obtenidas con los biosensores desarrollados al analizar muestras de leche cruda fueron significativamente diferentes a las obtenidas en las mismas condiciones para muestras de leche comercial tratada térmicamente (UHT). De acuerdo con los resultados obtenidos, este comportamiento puede atribuirse a la presencia de lactoperoxidasa en su forma activa en las muestras de leche cruda, constituyendo un interferente en la determinación de residuos de antibióticos con los métodos propuestos.

La lactoperoxidasa (LPO, EC 1.11.1.7) es una glicoproteína monomérica de aproximadamente 80 kDa [Shin, 2001] cuya principal función es catalizar la oxidación de diversas moléculas usando para ello H_2O_2 como sustrato [Kussendrager, 2000]. Esta enzima se encuentra naturalmente presente en la leche, en concentraciones comprendidas entre 20 y 41 mg L^{-1} [Blel, 2001]. La desnaturalización térmica de la LPO es irreversible y ocurre a través de dos procesos: a $\sim 40^\circ\text{C}$, se ve alterada la región periférica de la proteína, sin afectar a su actividad catalítica; mientras que a $\sim 70^\circ\text{C}$ se produce la inactivación catalítica de la enzima [Boscolo, 2009].

Con objeto de eliminar la interferencia producida por la LPO en las señales amperométricas registradas, las muestras de leche cruda se sometieron a un tratamiento

térmico consistente en su calentamiento a 80 °C durante 60 s, lo que permitió la inactivación térmica de esta enzima y la detección de residuos de antibióticos con los sensores desarrollados en este tipo de muestras.

3.4.15 Deposición enzimática de nanopartículas de plata

Para la deposición enzimática de nanopartículas de plata sobre la superficie de las inmunoplateformas para detección de SPY y su posterior interrogación por SECM, se depositó una alícuota de la disolución para la deposición enzimática de nanopartículas de plata, descrita en el *Apartado 3.3.4*, sobre toda la superficie de la placa de carbono vitrificado modificada, incubando durante 2 min. A continuación la placa se lavó con agua desionizada, con objeto de detener la reacción enzimática.

3.5 Cálculos

3.5.1 Curvas de calibrado y características analíticas

Los datos experimentales obtenidos a partir de las señales amperométricas, utilizados para la construcción de curvas de calibrado se ajustaron de acuerdo a la siguiente ecuación sigmoideal:

$$y = i_1 + \frac{i_2 - i_1}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x) \cdot p}} \quad (1)$$

donde i_2 e i_1 son los valores de corriente máximo y mínimo obtenidos, IC_{50} es la concentración de analito que produce el 50 % de la señal amperométrica máxima y p es la pendiente de Hill en el punto de inflexión de la curva sigmoideal.

En caso de normalización de las señales, la curva de calibrado se ajustó correspondiendo los valores y de la Ecuación 1, a los valores S_n , obtenidos de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$S_n = \frac{i - i_\infty}{i_0 - i_\infty} \quad (2)$$

siendo i , la señal amperométrica medida para una concentración determinada de analito; i_∞ , la corriente medida en presencia de un exceso de analito; i_0 , la corriente de fondo medida en ausencia de analito.

El límite de detección (**LD**) se calculó como la concentración de analito que produce una inhibición del 10 % en el enlace del trazador enzimático al receptor biológico (IC_{90}), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$IC_F = IC_{50} \left(\frac{F}{100 - F} \right)^{1/p} ; F = 90 \quad (3)$$

El intervalo dinámico se tomó como el intervalo de concentraciones del analito que producen una inhibición en el enlace del trazador enzimático comprendida entre 20 % y 80 %.

El porcentaje de reactividad cruzada (**%RC**) se calculó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\%RC = \frac{IC_{50}(\text{analito})}{IC_{50}(\text{especie interferente})} \times 100 \quad (4)$$

Todos los intervalos de confianza se calcularon para un nivel de probabilidad del 95 %.

La comparación estadística de los resultados obtenidos con un material de referencia con su valor certificado se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por el Instituto de Materiales y Medidas de Referencia [Lisinger, 2005]. Después de realizar varias medidas del material de referencia certificado, la diferencia absoluta entre el valor medio obtenido y el valor certificado (Δ_m) se puede calcular como:

$$\Delta_m = |c_m - c_{CRM}| \quad (5)$$

siendo c_m el valor medio obtenido de las medidas realizadas y c_{CRM} el valor certificado. Puesto que cada medida posee una incertidumbre u_m y el valor certificado del material de referencia se conoce también con una incertidumbre u_{CRM} especificada en su certificado, la incertidumbre de Δ_m se calcula de acuerdo a la siguiente expresión:

$$u_{\Delta} = \sqrt{u_m^2 + u_{CRM}^2} \quad (6)$$

donde u_{Δ} es la incertidumbre combinada del resultado obtenido para el valor certificado y el propio valor certificado; u_m es la incertidumbre de las medidas realizadas; y u_{CRM} es la incertidumbre del valor certificado. La incertidumbre expandida U_{Δ} , correspondiente a un intervalo de confianza de aproximadamente 95 %, se obtiene multiplicando u_{Δ} por el factor de cobertura: $k = 2$. Para evaluar el desempeño del método desarrollado se compara Δ_m con U_{Δ} . Si $\Delta_m \leq U_{\Delta}$ se considera que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos y el valor certificado.

Para calcular el límite de decisión (**CC α**) se analizaron un mínimo de 20 materiales blancos, enriquecidos con el analito al límite permitido (LMR). El límite de decisión (para $\alpha = 5\%$) fue igual a la concentración del límite permitido más 1.64 veces la desviación estándar obtenida.

Para calcular la capacidad de detección (**CC β**) se analizaron un mínimo de 20 materiales blancos, enriquecidos con el analito al límite de decisión (**CC α**). La capacidad de detección (para $\beta = 5\%$) fue igual al valor del límite de decisión más 1.64 veces la desviación estándar obtenida.

3.5.2 Otros cálculos realizados

El cálculo del porcentaje de recubrimiento aparente a partir de la resistencia a la transferencia de carga se realizó de acuerdo con la siguiente expresión de acuerdo con [Janek, 1998]:

$$\theta = \left(1 - \frac{R_{CT}^{\text{sin modificar}}}{R_{CT}^{\text{recubierto}}} \right) \times 100 \quad (7)$$

donde, θ es el porcentaje de recubrimiento aparente y R_{CT} es la resistencia a la transferencia de carga obtenida en los espectros de impedancia electroquímica para el electrodo sin modificar y tras su modificación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parte I.

Biosensores para la determinación de familias individuales de antibióticos

4.1 Magnetobiosensores

4.1.1 Determinación de tetraciclinas

4.1.2 Determinación de sulfonamidas

4.1.3 Determinación de antibióticos β -lactámicos

4.2 Biosensores integrados

4.2.1 Determinación de sulfonamidas

4.2.2 Determinación de antibióticos β -lactámicos

4.3 Comparación de metodologías

4.4 Otras estrategias analíticas

4.4.1 Microscopía electroquímica de barrido (SECM)

4.4.2 Célula de biocombustible (BFC)

Parte II.

Estrategias desarrolladas para la multidetección de residuos de diferentes familias de antibióticos

4.5 Inmunosensor integrado dual para la determinación simultánea de sulfonamidas y tetraciclinas

4.6 Magnetosensor de afinidad para la multidetección de sulfonamidas, tetraciclinas y antibióticos β -lactámicos

Parte I.

Biosensores para la determinación de familias
individuales de antibióticos

4.1 Magnetobiosensores

4.1.1 Determinación de tetraciclinas

Se ha desarrollado un magnetoinmunosensor amperométrico desechable para la determinación de residuos de tetraciclinas en leche, empleando un anticuerpo selectivo frente a esta familia de antibióticos, que se inmovilizó sobre la superficie de partículas magnéticas comerciales funcionalizadas con proteína G. Se seleccionó un esquema de tipo competitivo directo, en el que las tetraciclinas en la disolución analizada compiten con una concentración fija del trazador enzimático TC-HRP por los sitios de enlace antigénico de los anticuerpos inmovilizados (**Figura 4.1**).

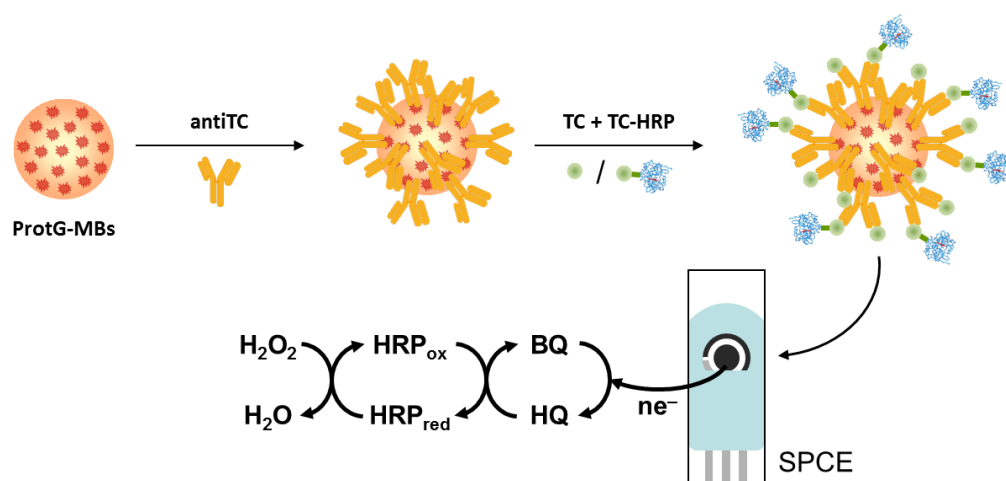


Figura 4.1. Representación esquemática del magnetoinmunosensor amperométrico desarrollado. Las tetraciclinas en la muestra compiten con una cantidad fija de TC-HRP por el número limitado de sitios de reconocimiento de los anticuerpos inmovilizados sobre partículas magnéticas funcionalizadas con Proteína G (ProtG-MBs). La adición del sustrato enzimático H_2O_2 permite la obtención de la señal electroanalítica en presencia del mediador redox HQ mediante la secuencia de reacciones mostrada.

La viabilidad del ensayo propuesto se verificó comparando las respuestas amperométricas obtenidas tras incubar las partículas modificadas con anticuerpo (MBs-antiTC) en disoluciones de trazador enzimático que contenían o no antibiótico. En estos experimentos la intensidad de corriente obtenida en ausencia de antibiótico fue aproximadamente dos veces superior a la obtenida en presencia de 222 ng mL^{-1} de TC, demostrando que se enlaza una menor cantidad de TC-HRP a los anticuerpos inmovilizados en presencia de antibiótico libre y por tanto que el inmunoensayo competitivo propuesto es adecuado para la determinación amperométrica de residuos de tetraciclinas.

4.1.1.1 Optimización de las variables experimentales

Se optimizaron todas las variables experimentales implicadas en la preparación y funcionamiento del magnetoinmunsensor, tomando como valores óptimos aquellos que proporcionaron una mejor relación entre las respuestas amperométricas obtenidas para disoluciones preparadas en ausencia de antibiótico libre y en presencia de una determinada cantidad de analito. El resto de las variables experimentales no optimizadas en este trabajo: mediador redox empleado (HQ), su concentración (1.0 mM), concentración del sustrato enzimático (H_2O_2 0.5 mM) y potencial de detección utilizado (−200 mV vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag) se seleccionaron de acuerdo con los resultados obtenidos en trabajos previos realizados en el grupo de investigación con MBs y electrodos serigrafiados de carbono [Eguílaz, 2010]. Debido a que el pH óptimo reportado para la enzima HRP se encuentra entre 6.0 y 7.0 [Singh, 2002; Nagaraja, 2009; Chen, 2011], se empleó como medio de medida una disolución reguladora de fosfato 50 mM, pH 6.0.

Optimización de las partículas magnéticas

Como se ha comentado anteriormente, los distintos tipos de proteínas bacterianas presentan afinidades de enlace variables frente a las distintas especies de inmunoglobulinas (ver **Tabla 2.5**), por lo que antes de proceder a la optimización de la cantidad de partículas magnéticas, se estudió el tipo de MBs, modificadas con ProtA o ProtG, más apropiado para la inmovilización de los anticuerpos antiTC. Para ello, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas tras la modificación de ProtA-MBs y ProtG-MBs con el anticuerpo empleado y la posterior incubación de los conjugados con disoluciones de trazador enzimático conteniendo o no 222 ng mL^{-1} de TC. A diferencia de los bioconjugados preparados con ProtA-MBs, los preparados con ProtG-MBs proporcionaban respuestas amperométricas superiores y eran capaces de discriminar entre disoluciones que contenían o no antibiótico por lo que se seleccionaron estas últimas como soporte más adecuado para la inmovilización del anticuerpo.

La cantidad de partículas magnéticas se optimizó comparando las señales amperométricas proporcionadas por diferentes magnetosensores preparados variando el volumen de la suspensión comercial de ProtG-MBs entre 1.0 y 6.0 μL (correspondientes a 30 – 180 μg de MBs). Estas ProtG-MBs se modificaron mediante incubación a 37°C durante 30 min en 50 μL de una disolución de antiTC $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ en PBS. A continuación, las MBs-antiTC se incubaron durante 30 min a 37°C en 50 μL de una disolución de TC-HRP (dilución 1/100) en PBST, conteniendo 0 ó 444 ng mL^{-1} de TC. Como se observa en la **Figura 4.2**, la relación entre las señales amperométricas obtenidas en ausencia y en presencia de TC aumentó desde 1.0 a 4.0 μL , manteniéndose constante para 5.0 μL y disminuyendo para volúmenes de 6.0 μL de ProtG-MBs, debido posiblemente al aumento en la resistencia a la transferencia electrónica para elevadas cantidades de MBs capturadas sobre el electrodo de trabajo del SPCE. Puesto que además se observó una mayor reproducibilidad de las medidas al emplear 5.0 μL de ProtG-MBs, se eligió esta cantidad como óptima para experimentos posteriores.

Modificación de las ProtG-MBs con antiTC

En primer lugar, se optimizó la concentración de la disolución de anticuerpo para modificar las ProtG-MBs. Para ello se prepararon diferentes magnetoinmunsensores variando la concentración de antiTC entre 0 y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Al igual que en el apartado anterior, las MBs

modificadas se incubaron en 50 μL de disoluciones de TC-HRP conteniendo 0 ó 444 ng mL^{-1} de TC. La relación entre las señales amperométricas obtenidas en ausencia y en presencia de TC (**Figura 4.3**) aumentó con la concentración de antiTC hasta 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, manteniéndose aproximadamente constante para mayores concentraciones a causa de la saturación de las MBs con el anticuerpo inmovilizado.

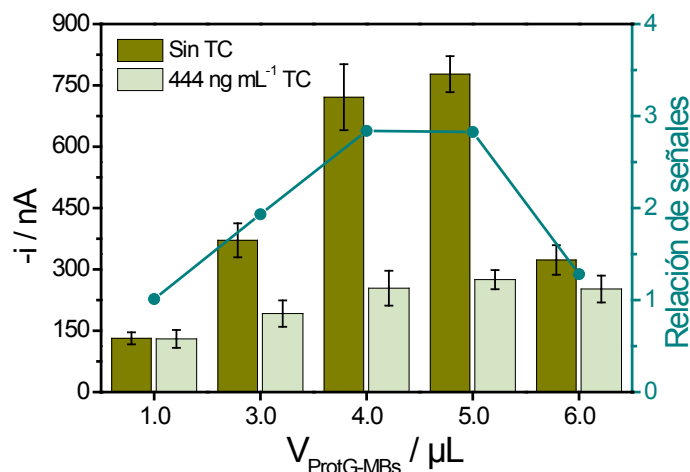


Figura 4.2. Respuestas amperométricas obtenidas con diferentes magnetoinmunosensores para 0 y 444 ng mL^{-1} de TC en PBST conteniendo TC-HRP 1/100, en función del volumen de la disolución comercial de ProtG-MBs. $E_{\text{ap}} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones entre las respuestas amperométricas obtenidas.

Aunque experimentalmente se obtuvo la mayor relación entre señales amperométricas para 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de antiTC, como solución de compromiso se decidió trabajar con una concentración de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ya que permitió obtener una buena señal amperométrica y minimizar el gasto de inmunorreactivo. Se optimizaron también el volumen de la disolución de antiTC y el tiempo de incubación con la misma. Las mayores señales amperométricas se obtuvieron trabajando con 50 μL de disolución de antiTC y un tiempo de incubación de 30 min.

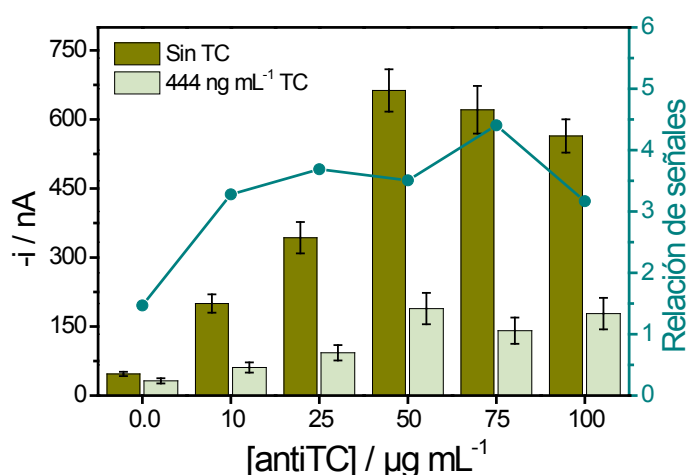


Figura 4.3. Respuestas amperométricas obtenidas con diferentes magnetoinmunosensores para 0 y 444 ng mL^{-1} de TC en PBST conteniendo TC-HRP 1/100, en función de la concentración de antiTC. $E_{\text{ap}} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones entre las respuestas amperométricas obtenidas.

Etapa de competición: Trazador enzimático

Para optimizar la concentración del trazador enzimático TC-HRP y dado que la casa comercial que lo suministra no proporciona la concentración de este reactivo, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas con diferentes magnetoinmunosensores llevando a cabo distintas diluciones de la disolución comercial comprendidas entre 1/500 y 1/50. Como se observa en la **Figura 4.4**, la relación entre las señales amperométricas obtenidas en ausencia y presencia de TC aumentó significativamente con la concentración del trazador enzimático hasta una dilución 1/100 y más moderadamente para diluciones menores por lo que se eligió una dilución 1/100 del trazador enzimático para trabajos posteriores. Cuando se optimizaron el volumen y el tiempo de incubación de la etapa de competición, se obtuvieron las mayores señales analíticas con 50 μL y 30 min, respectivamente.

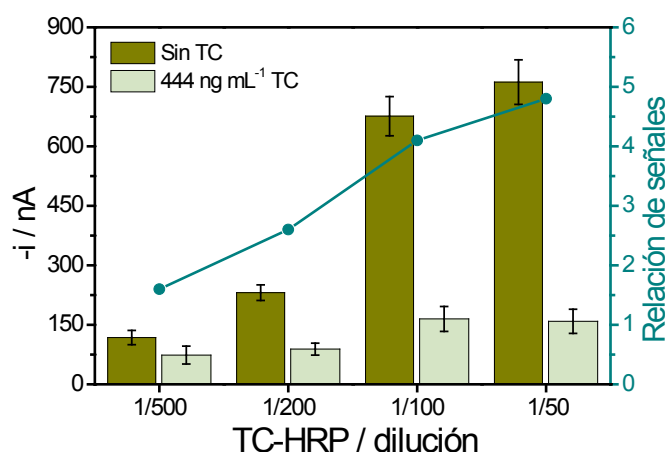


Figura 4.4. Respuestas amperométricas obtenidas con diferentes magnetoinmunosensores para 0 y 444 ng mL⁻¹ de TC en PBST en función de la concentración del trazador enzimático. $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones entre las respuestas amperométricas obtenidas.

4.1.1.2 Características analíticas del magnetoinmunosensor desarrollado

Para evaluar el comportamiento analítico del magnetoinmunosensor desarrollado, se eligió la TC como antibiótico modelo de la familia de las tetraciclinas. Se construyó una curva de calibrado incubando las MBs-antiTC en disoluciones de PBST conteniendo diferentes concentraciones de TC y la cantidad optimizada de TC-HRP. La curva de calibrado obtenida se muestra en la **Figura 4.5**, en la que se observa el hábito esperado para un formato de tipo competitivo, presentando un IC_{50} de (92 ± 8) ng mL⁻¹, un ID comprendido entre (12 ± 2) y (676 ± 60) ng mL⁻¹ y un LD de (3.9 ± 0.7) ng mL⁻¹. El LD obtenido, aproximadamente 25 veces inferior al LMR establecido por la legislación Europea en leche, demuestra las atractivas características del magnetoinmunosensor desarrollado para la determinación de bajos niveles de residuos de tetraciclinas en leche.

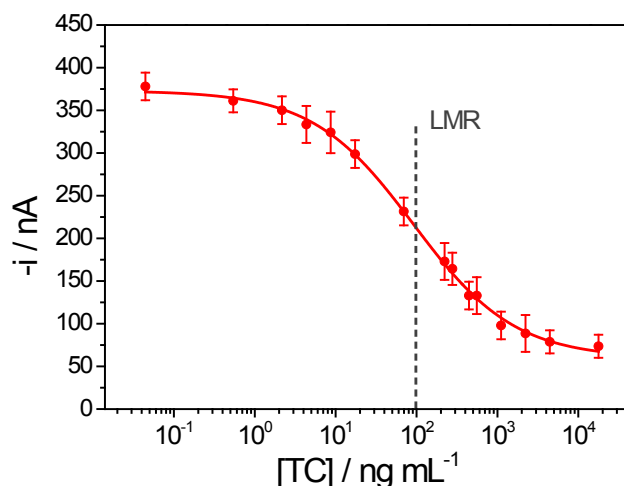


Figura 4.5. Curva de calibrado obtenida con el magnetosensor desarrollado para TC en PBST. $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se indica el LMR establecido en leche por la legislación Europea.

4.1.1.3 Características analíticas del magnetoinmunosensor desarrollado en leche

La aplicabilidad del magnetosensor desarrollado al análisis de muestras reales se evaluó construyendo curvas de calibrado para TC en muestras de leche entera UHT y leche entera UHT enriquecida con calcio, sin diluir o diluidas 1:1 con PBST. Las características analíticas obtenidas se resumen en la **Tabla 4.1**, e indicaron un comportamiento analítico atractivo del inmunosensor en las matrices estudiadas. En todos los casos se obtuvieron LDs muy por debajo de los LMRs establecidos, demostrando por tanto la idoneidad del magnetosensor para su aplicación a la detección de residuos de tetraciclinas en leche.

Tabla 4.1. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas para TC con el magnetoinmunosensor desarrollado en diversas matrices de leche entera UHT.

	Leche:PBST (1:1)	Leche enriquecida con Ca:PBST (1:1)	Leche enriquecida con Ca (sin diluir)
r^2	0.987	0.996	0.998
IC_{50} / ng mL ⁻¹	49 ± 5	58 ± 6	32 ± 4
ID / ng mL ⁻¹	6 ± 2 a 381 ± 19	18 ± 4 a 190 ± 9	5 ± 2 a 202 ± 12
LD / ng mL ⁻¹	1.9 ± 0.2	8.9 ± 0.9	1.7 ± 0.5

Como se observa en la **Figura 4.6**, en la que se comparan las curvas de calibrado obtenidas para TC en PBST y leche entera UHT diluida 1:1 con PBST, se obtuvieron siempre respuestas amperométricas mayores trabajando en matrices de leche en comparación con las medidas obtenidas en PBST, lo que puede atribuirse a la presencia de iones Ca^{2+} en leche. Se ha descrito que estos iones regulan la actividad catalítica de la HRP, llegando a ser esta enzima hasta 40 % menos activa en ausencia de los mismos [Coates, 1998].

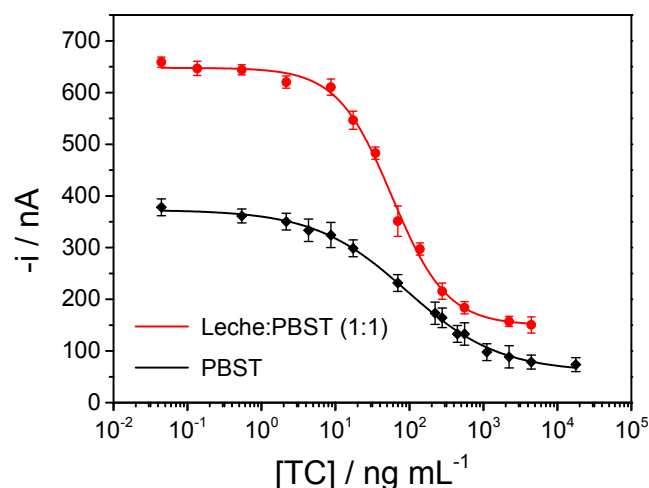


Figura 4.6. Comparación de las curvas de calibrado obtenidas para TC en PBST y leche entera UHT diluida 1:1 con PBST. $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$).

Este hecho se verificó evaluando el comportamiento del magnetoinmuno sensor en disoluciones de PBST suplementadas con la misma concentración de cloruro de calcio que la concentración de Ca^{2+} que contiene la leche enriquecida analizada (1.6 g L^{-1}). Como era de esperar, las señales analíticas fueron mucho mayores en PBST enriquecido con calcio que las registradas en PBST, lo que confirmó el aumento de la actividad enzimática por la presencia de los iones Ca^{2+} . Se descartó una posible interferencia de elevadas concentraciones de calcio sobre el reconocimiento inmunoquímico, ya que se ha descrito [Parker, 2009] que una concentración de $CaCl_2$ de hasta 18 mM estabiliza las proteínas lácteas pero no tiene efecto sobre la actividad de los anticuerpos.

Es sabido que las tetraciclinas pueden formar complejos con diversos cationes, entre ellos el Ca^{2+} presente en la leche [Wessels, 1998; Jin, 2007], por lo que se decidió estudiar el efecto de la presencia de estos iones en la matriz analizada sobre las respuestas proporcionadas por el magnetosensor. Para ello se compararon las señales amperométricas obtenidas para una disolución de leche UHT enriquecida con calcio, conteniendo 88 ng mL^{-1} de TC y almacenada a 4°C , antes de analizarla. Como se muestra en la Figura 4.7, los resultados obtenidos demostraron que no había variaciones significativas entre las intensidades de corriente registradas durante al menos 5 días, demostrando que el funcionamiento del magnetoinmuno sensor desarrollado no se ve afectado por la presencia de iones Ca^{2+} en las muestras analizadas, y que por tanto no es necesario suplementarlas con agentes secuestrantes como el AEDT para evitar su interferencia al realizar el análisis [Jeon, 2008^a].

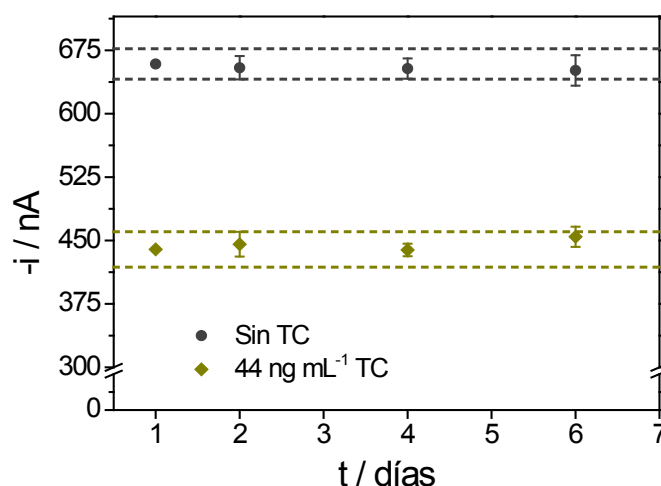


Figura 4.7. Gráfico de control construido para el estudio de la influencia de los iones Ca^{2+} en las disoluciones de leche analizadas. Valor central de cada una de las series (ausencia/presencia de TC): valor medio obtenido para cinco medidas amperométricas realizadas el primer día del estudio; límites de control superior e inferior: $3s$, siendo s la desviación estándar de estas cinco medidas. $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$).

Con el fin de estudiar la respuesta del anticuerpo empleado frente a otros antibióticos de la familia de las TCs se construyeron también las curvas de calibrado en leche entera UHT diluida 1:1 con PBST para los tres antibióticos más comúnmente empleados junto con la TC: clortetraciclina (CTC), oxitetraciclina (OTC) y doxiciclina (DXC). Los calibrados obtenidos se muestran en la **Figura 4.8** y en la **Tabla 4.2** se resumen las características analíticas derivadas de los mismos.

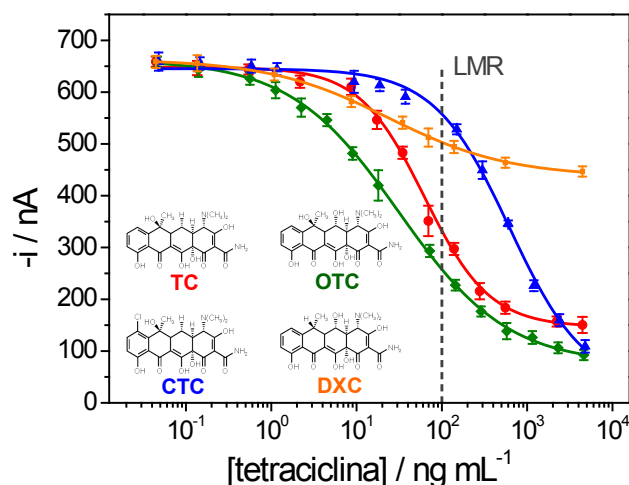


Figura 4.8. Curvas de calibrado obtenidas con el magnetoinmunosensor desarrollado para diferentes tetraciclinas (TC, OTC, CTC y DXC) en leche entera UHT:PBST (1:1). $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se indica el LMR establecido en leche por la legislación Europea.

Como se observa, además de la TC, OTC y CTC fueron eficientemente reconocidas por el magnetoinmunosensor. El LD obtenido para OTC se encuentra muy por debajo del LMR establecido por la legislación y, aunque para la CTC se observó un peor reconocimiento, el LD estimado de 67 ng mL^{-1} también está por debajo del LMR.

Tabla 4.2. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas para diferentes TCs con el magnetosensor desarrollado en leche entera UHT:PBST (1:1). Los porcentajes de reactividad cruzada (%RC) se calcularon de acuerdo a la Ecuación (4).

	TC	OTC	CTC	DXC
r^2	0.996	0.999	0.996	0.999
$IC_{50} / \text{ng mL}^{-1}$	58 ± 6	31 ± 4	537 ± 28	25 ± 2
$ID / \text{ng mL}^{-1}$	18 ± 4 a 190 ± 9	4 ± 1 a 242 ± 14	144 ± 8 a 2002 ± 106	2.6 ± 0.2 a 235 ± 12
$LD / \text{ng mL}^{-1}$	8.9 ± 0.9	1.2 ± 0.1	67 ± 7	0.69 ± 0.07
%RC	100	192	12	246

Se evaluó también la reproducibilidad de las respuestas amperométricas obtenidas con diferentes inmunosensores preparados el mismo día o en días diferentes. Para ello, se midieron las corrientes obtenidas en PBST y en leche entera UHT diluida 1:1 con PBST, en ausencia y en presencia de TC. Preparando seis magnetoinmunosensores diferentes el mismo día se obtuvo una RSD del 1.3 % para disoluciones de leche entera UHT:PBST (1:1) conteniendo 44 ng mL^{-1} de TC. Para cuatro magnetoinmunosensores preparados en días diferentes, se obtuvieron valores de RSD del 2.6 % y 5.2 % en disoluciones de PBST y leche diluida con PBST, respectivamente, en ausencia de antibiótico. Estos resultados demostraron que el proceso de fabricación del magnetoinmunosensor fue fiable, permitiendo obtener respuestas amperométricas reproducibles con diferentes magnetosensores preparados de la misma manera.

Se estudió la estabilidad con el tiempo de los inmunoconjugados MBs-antiTC, modificando el mismo día diferentes lotes de partículas magnéticas con el anticuerpo y almacenándolos a 4°C en tubos de plástico con $50 \mu\text{L}$ de PBS. El día de preparación de los lotes se midieron las señales amperométricas obtenidas tras incubar cinco de ellos en disoluciones de leche diluida con PBST (1:1) conteniendo TC-HRP y 0 ó 44 ng mL^{-1} de TC. Cada día de control se tomaron dos lotes de estos conjugados y se incubaron de la misma manera. Con los datos obtenidos se construyó el gráfico de control mostrado en la **Figura 4.9**. Como valor central de cada una de las series (ausencia/presencia de TC) se tomó el valor medio obtenido para las cinco medidas amperométricas realizadas el primer día del estudio y como límites de control superior e inferior el triple de la desviación estándar de estas cinco medidas.

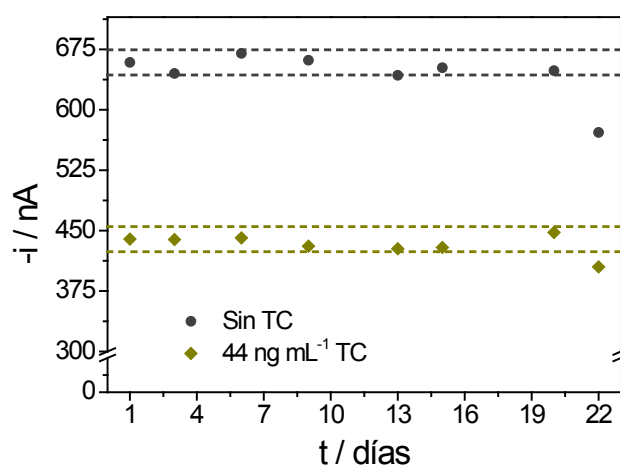


Figura 4.9. Gráfico de control construido para el estudio de la estabilidad de los conjugados MBs-antiTC almacenados en PBS a 4°C . Las señales corresponden a las medidas amperométricas registradas tras la incubación de estos conjugados en disoluciones de TC-HRP preparadas en leche:PBST (1:1) en ausencia o presencia de TC. $E_{ap} = -200 \text{ mV}$ (vs. Ag).

Como puede observarse, las respuestas amperométricas obtenidas para ambas series permanecieron dentro de los límites de control durante 20 días, indicando una elevada estabilidad de los inmunoconjugados MBs-antiTC, que pueden prepararse y almacenarse hasta su utilización.

4.1.1.4 Selectividad del magnetoinmunosensor

La selectividad del magnetoinmunosensor desarrollado se examinó evaluando su respuesta frente a seis antimicrobianos pertenecientes a otras familias de antibióticos frecuentemente empleadas en el tratamiento de vacas lecheras. En la **Figura 4.10** se comparan las respuestas amperométricas obtenidas con el magnetoinmunosensor en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con PBST, conteniendo TC-HRP y los antibióticos potencialmente interferentes en concentraciones 0, 0.3 ó 10 μM . Como puede apreciarse, no se observó un reconocimiento significativo, incluso a elevadas concentraciones (10 μM) para SPY, AMOX y ENRO. Aunque para CEF, AMP y PENG se observó una ligera disminución de la señal amperométrica a elevadas concentraciones, el porcentaje de reactividad cruzada calculado (ver *Apartado 3.5*) fue en todos los casos inferior al 1 %, demostrando la ausencia de una competición significativa. Estos resultados demostraron la selectividad del anticuerpo empleado en el diseño del magnetoinmunosensor en el reconocimiento de antibióticos pertenecientes a la familia de las tetraciclinas.

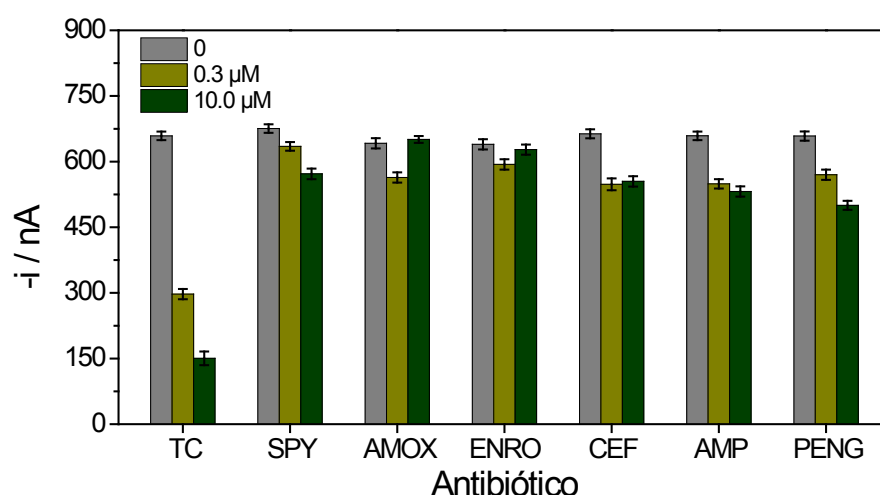


Figura 4.10. Estudio de la selectividad del anticuerpo empleado frente a seis antibióticos potencialmente interferentes (SPY, AMOX, ENRO, CEF, AMP y PENG). Valores de intensidad de corriente correspondientes a señales amperométricas obtenidas a -200 mV (vs. Ag) tras incubar las MBs-antiTC en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con PBST, conteniendo TC-HRP y cada uno de los antibióticos potencialmente interferentes a tres niveles de concentración (0, 0.3 ó 10 μM). A modo de comparación se muestran también las señales obtenidas para TC. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$).

4.1.1.5 Determinación de tetraciclinas en leche

La utilidad del magnetoinmunosensor desarrollado en el análisis de muestras reales se evaluó analizando disoluciones de leche entera enriquecida con calcio, conteniendo 44 ng mL^{-1} de TC. Para ello se interpolaron los valores de intensidad de corriente registrados tras el análisis de estas muestras en la curva de calibrado construida previamente para este antibiótico en la

misma matriz (ver **Figura 4.8**). En el análisis de ocho muestras diferentes se obtuvo una concentración y recuperación media de (43.8 ± 0.5) ng mL⁻¹ y (99 ± 1) %, respectivamente.

El correcto funcionamiento del biosensor se validó mediante el análisis de un material de referencia certificado, una muestra de leche semidesnatada liofilizada con un contenido certificado de OTC de (101 ± 11) µg kg⁻¹. Antes de proceder al análisis de este material de referencia se comprobó la posible existencia de efecto matriz, comparando las señales amperométricas obtenidas tras la incubación de las MBs-antiTC con disoluciones de la leche certificada reconstituida o con leche entera UHT, en ambos casos diluidas 1:1 con PBST y conteniendo cuatro concentraciones diferentes de OTC: 100, 200, 300 y 400 ng mL⁻¹. Puesto que no se observaron diferencias significativas en los valores medios de intensidad de corriente registrados para ambas matrices a los diferentes niveles de concentración mencionados, la determinación de OTC en la leche certificada se realizó por simple interpolación de los valores de corriente medidos en la curva de calibrado construida para OTC en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con PBST (ver **Figura 4.8**).

Siguiendo este protocolo, se analizaron ocho alícuotas del material de referencia certificado, proporcionando un contenido medio de OTC de (105 ± 5) µg kg⁻¹, con una RSD del 5.4 %. El contenido medio encontrado se comparó estadísticamente con el valor certificado de acuerdo al procedimiento descrito por el Instituto de Materiales y Medidas de Referencia [Lisinger, 2005] (ver *Apartado 3.5*), obteniéndose Δ_m (4.3) < U_Δ (11.7) por lo que se puede concluir que no existen diferencias significativas entre el valor certificado y el contenido medio de OTC determinado con el magnetoinmunsensor, a un nivel de probabilidad del 95 %.

Estos resultados demostraron la utilidad y fiabilidad del magnetosensor desechable desarrollado en la determinación de bajas concentraciones de residuos de tetraciclinas en leche, tras una simple dilución con la disolución reguladora de medida y en un tiempo de ensayo de aproximadamente 30 minutos (una vez que se han preparado los inmunoconjugados).

4.1.1.6 Detección rápida de tetraciclinas

Con objeto de diseñar un posible dispositivo rápido de alarma para la detección de tetraciclinas, se evaluó la posibilidad de reducir aún más el tiempo requerido para llevar a cabo la detección. Para ello, se compararon las señales amperométricas medidas con el magnetoinmunsensor tras incubar los conjugados MBs-antiTC durante diferentes períodos de tiempo, en leche conteniendo 0 ó 100 ng mL⁻¹ de TC (LMR establecido por la legislación), tras su dilución 1:1 con PBST. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4.11**.

Como era de esperar, las respuestas amperométricas registradas fueron menores al disminuir el tiempo de incubación de la etapa de competición. Sin embargo, la relación obtenida para las señales en ausencia y presencia de TC después de un período de tan sólo 5 min (16 %, frente al 34 % obtenido tras 30 min de incubación) fue suficiente para establecer una diferencia significativa entre muestras libres de TC o que contienen este antibiótico al nivel regulado por la legislación Europea. Estos resultados sugieren la posible aplicabilidad de la metodología desarrollada como método rápido de alarma para el cribado de muestras de acuerdo con su contenido de tetraciclinas.

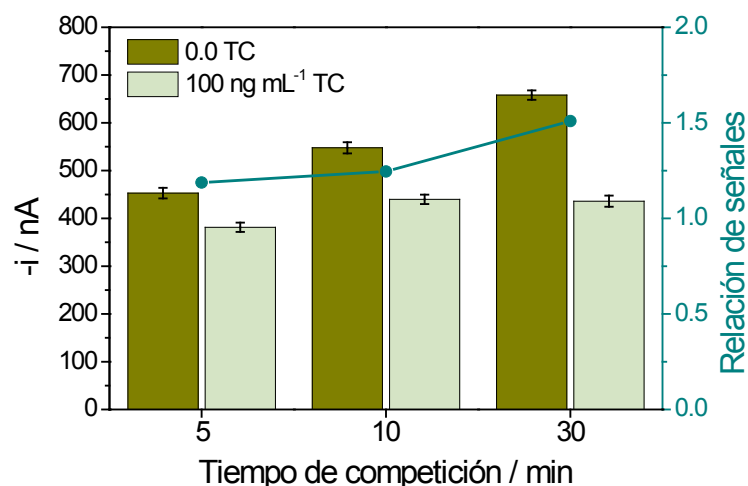


Figura 4.11. Señales amperométricas obtenidas a -200 mV (vs. Ag) tras la incubación de los inmunoconjugados MBs-antiTC durante diferentes tiempos en leche conteniendo 0 ó 100 ng mL^{-1} de TC, diluida 1:1 con PBST y en presencia de la cantidad optimizada de TC-HRP. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$).

4.1.1.7 Conclusiones

Los resultados obtenidos demostraron que el magnetoinmunosensor amperométrico desarrollado es específico y sensible, permitiendo la determinación de bajas concentraciones de antibióticos pertenecientes a la familia de las tetraciclinas en leche, de una manera rápida y fiable tras una simple dilución de la muestra. Los LDs obtenidos, comprendidos entre 0.69 y 67 ng mL^{-1} , son inferiores a los LMRs establecidos por la legislación Europea en leche.

Se demostró también que el sistema empleado es capaz de determinar cuantitativamente la presencia de residuos de tetraciclinas en matrices con un elevado contenido de iones Ca^{2+} , no siendo necesaria la adición de reactivos complejantes, como el AEDT, para minimizar su interferencia.

Se evaluó también la posibilidad de llevar a cabo una detección rápida de tetraciclinas en leche, concluyendo que la metodología desarrollada también puede ser empleada como sistema de alarma para la detección de residuos al LMR establecido por la legislación en un tiempo de tan sólo cinco minutos, lo que permitiría realizar un cribado rápido de muestras y llevar a cabo posteriormente la determinación cuantitativa sólo en aquellas que proporcionen un resultado positivo.

Los inmunoconjugados MBs-antiTC presentaron una elevada estabilidad, sin pérdida apreciable en la intensidad de las respuestas amperométricas obtenidas con los inmunosensores preparados a partir de los conjugados durante aproximadamente 20 días, por lo que dichos inmunoconjugados pueden ser preparados y almacenados hasta su uso.

El atractivo funcionamiento analítico del magnetosensor desarrollado, junto con el uso de superficies electrónicas desechables, hacen de la metodología propuesta una alternativa útil y asequible para la determinación de residuos de tetraciclinas en leche a los niveles requeridos por la legislación Europea vigente.

4.1.2 Determinación de sulfonamidas

De manera análoga al biosensor comentado en el apartado anterior, se desarrolló un magnetoinmunsensor amperométrico desechable para la determinación de residuos de sulfonamidas en leche, inmovilizando un anticuerpo selectivo frente a la familia de las sulfonamidas sobre la superficie de partículas magnéticas comerciales funcionalizadas con proteína G. Para la cuantificación de los analitos estudiados se empleó nuevamente un formato competitivo directo, en el que las sulfonamidas presentes en la muestra compiten con una concentración fija del trazador enzimático SPY-HRP por los sitios de reconocimiento antigénico de los anticuerpos inmovilizados (**Figura 4.12**).

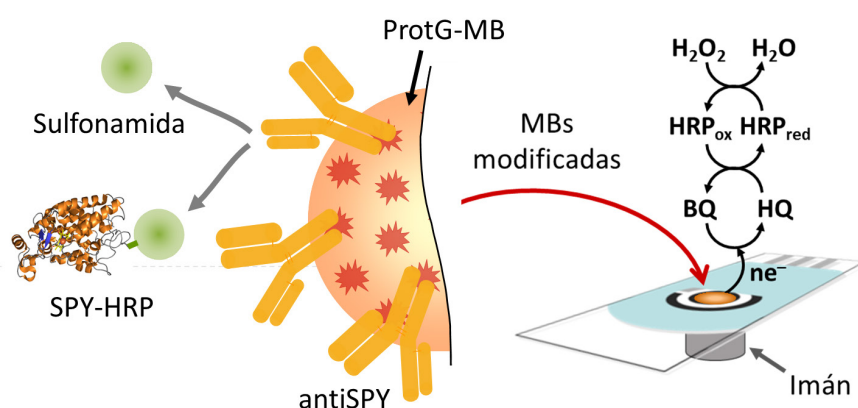


Figura 4.12. Representación esquemática del magnetoinmunsensor amperométrico desarrollado para la determinación de sulfonamidas. En el formato competitivo directo empleado, las sulfonamidas compiten con una cantidad fija de SPY-HRP por los sitios de reconocimiento de los anticuerpos inmovilizados sobre ProtG-MBs. Tras el reconocimiento antigénico, las MBs modificadas se capturan magnéticamente sobre la superficie de un SPCE. La adición del sustrato enzimático H_2O_2 en presencia del mediador redox HQ permite la obtención de la respuesta amperométrica.

La idoneidad del ensayo propuesto se verificó comparando las respuestas amperométricas obtenidas tras incubar las MBs-ProtG modificadas con el anticuerpo (antiSPY) en disoluciones de trazador enzimático (SPY-HRP) conteniendo 0 ó 250 ng mL^{-1} de SPY. Los resultados obtenidos demostraron que la intensidad de corriente obtenida en ausencia de antibiótico fue aproximadamente tres veces superior a la obtenida en presencia del mismo, confirmando que se enlaza una menor cantidad de SPY-HRP a los anticuerpos inmovilizados en presencia de antibiótico libre y por tanto que el inmunoensayo competitivo propuesto es adecuado para la detección electroquímica de sulfonamidas.

4.1.2.1 Optimización de las variables experimentales

Con el fin de obtener los mejores resultados se optimizaron las variables experimentales implicadas en la preparación y funcionamiento del magnetoinmunsensor. Como se comentó en el apartado anterior (*Sección 4.1.1.1*), las variables implicadas en la medida electroquímica fueron las optimizadas en trabajos previos realizados en el grupo de investigación, por lo que para el desarrollo del magnetoinmunsensor de sulfonamidas las variables optimizadas fueron: el tipo y cantidad de partículas magnéticas, el volumen, concentración y tiempo de incubación del anticuerpo y el volumen, concentración y tiempo de incubación del trazador enzimático.

Optimización de las partículas magnéticas

En primer lugar se estudió el tipo de MBs empleadas para la preparación del magnetosensor, comparando las respuestas amperométricas obtenidas tras la modificación de ProtA-MBs y ProtG-MBs con el antiSPY. Para ello se tomaron 5 μL de cada una de las suspensiones comerciales de ProtA-MBs o ProtG-MBs y se modificaron mediante incubación a 37 °C durante 30 min en 100 μL de una disolución de antiSPY 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A continuación, tras los lavados realizados con ayuda de la separación magnética, las MBs modificadas se incubaron durante 30 min a 37 °C en 50 μL de una disolución de SPY-HRP 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en PBST, conteniendo 0 ó 250 ng mL^{-1} de SPY y procediendo a continuación a la medida amperométrica. Mientras que la relación entre las señales obtenidas en ausencia y presencia de antibiótico fue de 3.2 para ProtA-MBs, se obtuvo una relación de 5.3 para ProtG-MBs, por lo que se decidió emplear estas últimas para experimentos posteriores.

La cantidad de partículas magnéticas se optimizó comparando las señales amperométricas proporcionadas por diferentes magnetosensores elaborados variando el volumen empleado de la suspensión comercial de ProtG-MBs entre 1.0 y 6.0 μL (correspondientes a 30 – 180 μg de MBs). Las partículas se incubaron en 50 μL de una disolución de antiSPY 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en PBS y tras las etapas de lavado y separación magnética, los conjugados así preparados se incubaron posteriormente con 50 μL de una disolución de SPY-HRP 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ preparada en PBST y conteniendo 0 ó 25 ng mL^{-1} de SPY, para cada volumen de MBs estudiado. Como se observa en la **Figura 4.13**, la relación entre las señales amperométricas obtenidas en ausencia de antibiótico y las obtenidas en presencia de SPY aumentó hasta aproximadamente 5.0 μL , disminuyendo ligeramente para valores superiores debido posiblemente al aumento de la resistencia a la transferencia electrónica para elevadas cantidades de MBs. Puesto que se observó además una mayor irreproducibilidad en las señales amperométricas registradas trabajando con volúmenes inferiores a 4.0 μL , se decidió trabajar con 5.0 μL de MBs.

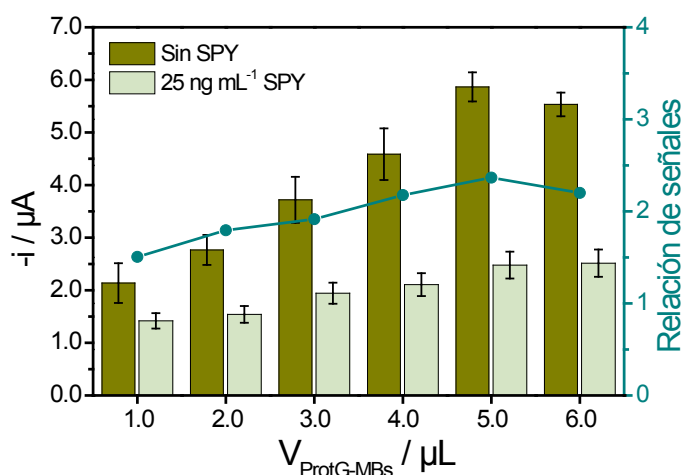


Figura 4.13. Respuestas amperométricas obtenidas tras incubar diferentes volúmenes de ProtG-MBs modificadas con antiSPY en disoluciones de SPY-HRP conteniendo 0 ó 25 ng mL^{-1} de SPY. $E_{\text{ap}} = -200 \text{ mV}$ (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones entre las respuestas amperométricas obtenidas.

Modificación de las ProtG-MBs con antiSPY

Con el fin de optimizar la concentración de anticuerpo para modificar las partículas magnéticas, se prepararon diferentes magnetoinmunosensores variando la concentración de la disolución de antiSPY entre 0 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las MBs así modificadas se incubaron posteriormente en 50 μL de disoluciones de SPY-HRP conteniendo 0 ó 25 ng mL^{-1} de SPY. La relación entre las señales amperométricas obtenidas en ausencia y en presencia de SPY (**Figura 4.14**) aumentó con la concentración de antiSPY hasta una concentración de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, manteniéndose prácticamente constante para concentraciones superiores, debido a la saturación de las MBs con el anticuerpo inmovilizado por la ProtG. Se eligió por tanto una concentración de anticuerpo de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para la preparación del magnetoinmunosensor. Se optimizó también el volumen de la disolución de antiSPY con el que se incuban las MBs y el tiempo de incubación. Las mayores señales amperométricas obtenidas para disoluciones de SPY-HRP en ausencia de antibiótico libre se consiguieron incubando con 50 μL de la disolución de anticuerpo durante 30 min, condiciones seleccionadas para trabajos posteriores.

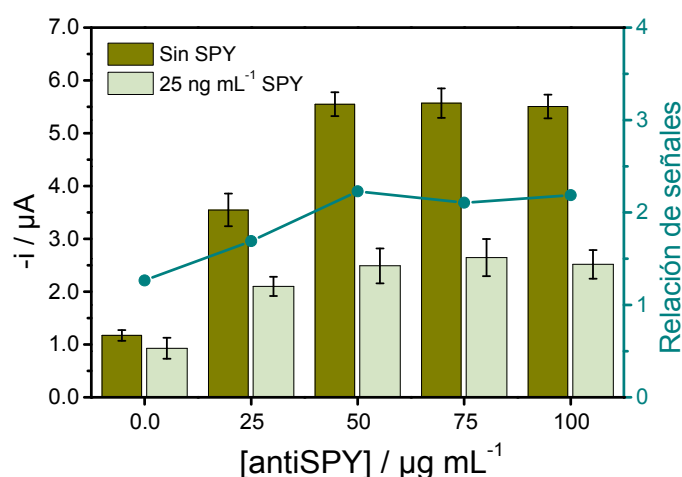


Figura 4.14. Respuestas amperométricas obtenidas tras incubar ProtG-MBs modificadas con disoluciones de antiSPY de concentraciones diferentes en disoluciones de SPY-HRP conteniendo 0 ó 25 ng mL^{-1} de SPY. $E_{ap} = -200 \text{ mV}$ (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones entre las respuestas amperométricas obtenidas.

Eta de competición: Trazador enzimático

Para seleccionar la concentración de trazador enzimático SPY-HRP se compararon las respuestas amperométricas obtenidas variando su concentración entre 0.5 y 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Según se observa en la **Figura 4.15**, las señales amperométricas medidas en ausencia de antibiótico libre aumentaron al aumentar la concentración de trazador enzimático. Sin embargo, la relación entre las señales amperométricas en ausencia y en presencia de antibiótico (25 ng mL^{-1} de SPY) aumentó significativamente con la concentración del trazador enzimático hasta 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, permaneciendo aproximadamente constante para concentraciones superiores, por lo que se eligió esta concentración para trabajos posteriores. El comportamiento observado puede ser debido a la adsorción inespecífica a elevadas concentraciones de trazador enzimático sobre la superficie de las MBs, haciendo que aumenten también las señales amperométricas medidas en presencia de SPY. Nuevamente, en la optimización del volumen y tiempo de incubación en la

etapa de competición, las mayores señales analíticas se obtuvieron trabajando con un volumen de 50 μL y un tiempo de incubación de 30 min.

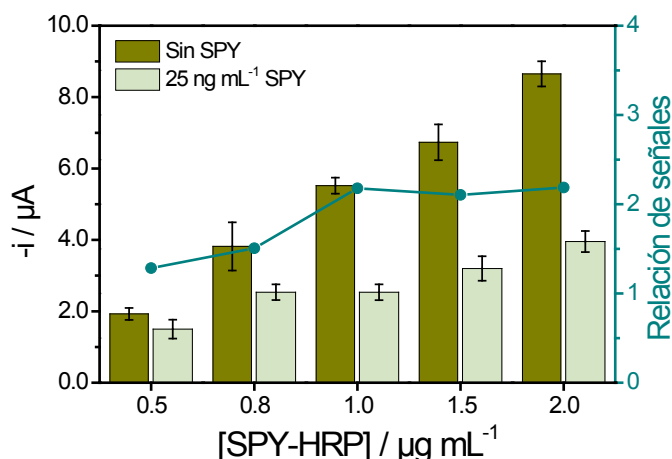


Figura 4.15. Respuestas amperométricas obtenidas tras incubar ProtG-MBs modificadas con antiSPY en disoluciones conteniendo diferentes concentraciones de SPY-HRP y 0 ó 25 ng mL^{-1} de SPY. $E_{\text{ap}} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones entre las respuestas amperométricas obtenidas.

4.1.2.2 Características analíticas del magnetoinmunosensor desarrollado

Para evaluar el comportamiento analítico del magnetoinmunosensor desarrollado se eligió la SPY como antibiótico modelo de la familia de las sulfonamidas. Se construyeron curvas de calibrado incubando las MBs-antiSPY en disoluciones de PBST o leche entera UHT diluida 1:1 con PBST, conteniendo diferentes concentraciones de SPY y 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de SPY-HRP. Las curvas de calibrado se muestran en la **Figura 4.16** y las características analíticas derivadas de las mismas se resumen en la **Tabla 4.3**.

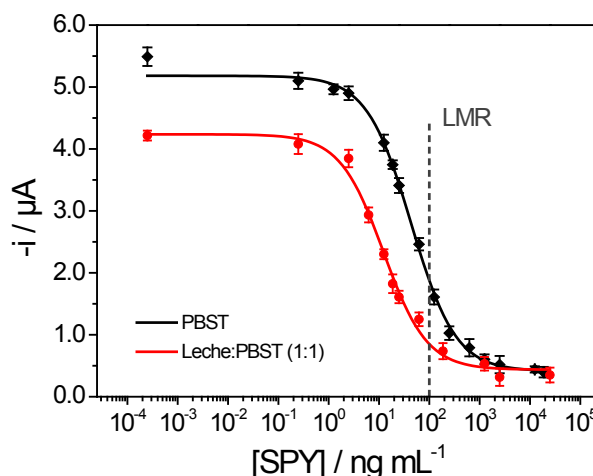


Figura 4.16. Curvas de calibrado obtenidas para SPY en PBST y leche entera UHT:PBST (1:1). $E_{\text{ap}} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se indica el LMR establecido en leche por la legislación Europea.

Tabla 4.3. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas con el magnetoinmunosensor desarrollado para SPY en PBST y leche entera UHT:PBST (1:1).

	PBST	Leche entera UHT:PBST (1:1)
r^2	0.997	0.992
$IC_{50} / \text{ng mL}^{-1}$	41.9 ± 0.2	12.27 ± 0.04
$ID / \text{ng mL}^{-1}$	9.79 ± 0.04 a 179.1 ± 0.7	3.08 ± 0.01 a 48.9 ± 0.2
$LD / \text{ng mL}^{-1}$	4.18 ± 0.02	1.369 ± 0.005

Los resultados obtenidos demostraron el buen comportamiento analítico del inmunosensor desarrollado, capaz de proporcionar un LD unas 70 veces inferior al LMR establecido por la legislación Europea, lo que demostró su idoneidad para la aplicación a la determinación de residuos de sulfonamidas en leche.

Se evaluó también la reproducibilidad de las respuestas obtenidas con diferentes magnetoinmunosensores preparados de la misma manera el mismo día o en días diferentes. El estudio se realizó comparando las señales amperométricas obtenidas en leche entera UHT diluida 1:1 con PBST, conteniendo SPY-HRP y en ausencia de antibióticos. Considerando los resultados obtenidos con cinco sensores se obtuvieron valores de RSD del 2.7 y del 7.9 % para magnetoinmunosensores preparados el mismo y en distintos días, respectivamente. Estos resultados demostraron que el proceso de fabricación del biosensor fue fiable, permitiendo obtener respuestas amperométricas reproducibles con diferentes magnetoinmunosensores preparados de la misma manera.

4.1.2.3 Selectividad del magnetoinmunosensor

La selectividad del magnetosensor desarrollado se examinó evaluando su respuesta frente a otros seis antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias de antibióticos y que son también frecuentemente empleados en el tratamiento de vacas lecheras. En la **Figura 4.17** se muestra la comparación de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia y en presencia de estos antibióticos potencialmente interferentes para una concentración 200 nM en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con PBST y conteniendo SPY-HRP. Como puede observarse, no se obtuvo un reconocimiento significativo para ninguno de los antibióticos potencialmente interferentes, demostrando la elevada especificidad del magnetoinmunosensor implementado para el reconocimiento de antibióticos pertenecientes únicamente a la familia de las sulfonamidas.

4.1.2.4 Determinación de sulfonamidas en leche

La utilidad del magnetoinmunosensor desarrollado para el análisis de muestras reales se evaluó analizando disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con PBST conteniendo 12 ng mL⁻¹ de SPY. Los valores de intensidad de corriente obtenidos con estas disoluciones se interpolaron en la curva de calibrado construida para este antibiótico en la misma matriz (ver **Figura 4.16**). En el análisis de cinco muestras se obtuvieron una concentración y recuperación medias de (12 ± 1) ng mL⁻¹ y (99 ± 9) %, respectivamente. Estos resultados demostraron la utilidad y fiabilidad del magnetoinmunosensor desechable desarrollado para la determinación de bajos niveles de residuos de sulfonamidas en leche, tras una simple dilución de la muestra y en un tiempo de ensayo de aproximadamente 30 min (una vez que se han preparado las MBs-antiSPY).

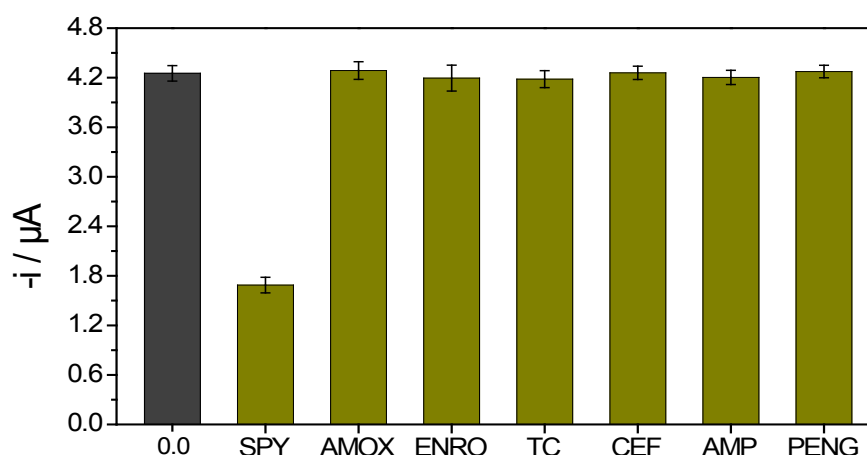


Figura 4.17. Estudio de la selectividad del magnetoinmunosensor desarrollado frente a seis antibióticos potencialmente interferentes (AMOX, ENRO, TC, CEF, AMP y PENG). Se muestran las señales amperométricas obtenidas tras incubar las MBs-antiSPY en disoluciones de leche entera UHT:PBST (1:1) conteniendo SPY-HRP, en ausencia y en presencia del antibiótico estudiado en concentración 200 nM. A modo de comparación se muestra también la señal obtenida para SPY. $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$).

4.1.2.5 Conclusiones

El magnetoinmunosensor desarrollado permitió la determinación de residuos de sulfonamidas en leche con LDs considerablemente inferiores a los LMRs. Los LDs e IDs obtenidos son apropiados para la cuantificación de estos residuos a los niveles de interés.

El magnetoinmunosensor puesto a punto demostró también una notable selectividad frente a antimicrobianos pertenecientes a otras familias de antibióticos, demostrando la marcada selectividad del anticuerpo empleado hacia los antibióticos pertenecientes a la familia de las sulfonamidas. Los resultados obtenidos también pusieron de manifiesto la elevada reproducibilidad de la metodología analítica desarrollada, que incluye tanto la modificación de las MBs y el ensayo competitivo, como la captura magnética de las mismas y la detección amperométrica final.

La buena recuperación que resultó en el análisis de una muestra de leche enriquecida con SPY demostró la aplicabilidad del magnetoinmunosensor para la determinación de bajos niveles de residuos de sulfonamidas en este tipo de matrices.

4.1.3 Determinación de antibióticos β -lactámicos

Se ha desarrollado un magnetosensor amperométrico de afinidad desechable para la determinación de residuos de antibióticos β -lactámicos en leche, basado en el empleo de una proteína fijadora de penicilina (PBP) recombinante y un ensayo competitivo directo entre los antibióticos en la muestra y el trazador enzimático PENG-HRP. La inmovilización de la PBP se realizó aprovechando el *tag* de histidinas con el que fue hiperexpresada para formar un complejo de coordinación, logrando una inmovilización estable, orientada y reproducible sobre partículas magnéticas comerciales modificadas con un complejo de cobalto (HisTag-MBs) (ver **Figura 4.18**).

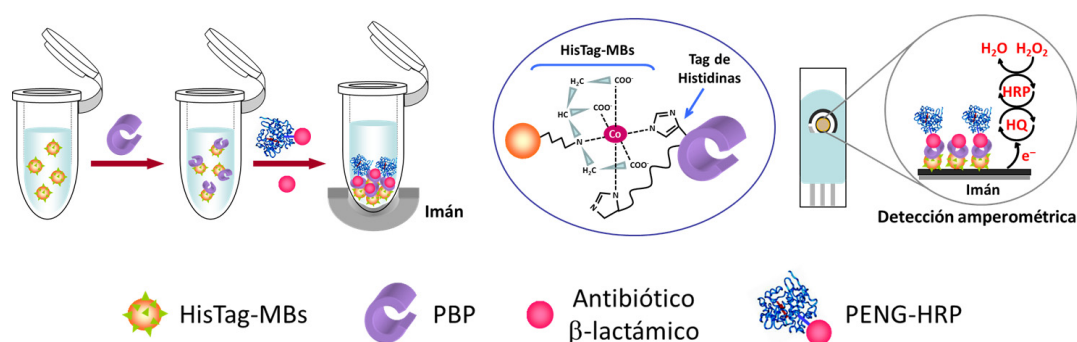


Figura 4.18. Representación esquemática de las etapas implicadas en la construcción del magnetosensor de afinidad desarrollado para la determinación de residuos de antibióticos β -lactámicos en leche, así como la cadena de reacciones que permite la detección amperométrica.

Se utilizó la PENG como antibiótico modelo para la optimización de las variables experimentales implicadas en el funcionamiento del magnetobiosensor. Como en capítulos anteriores, se utilizó un potencial de detección de -200 mV (vs. Ag) para llevar a cabo las medidas amperométricas. El adecuado funcionamiento del ensayo propuesto se verificó mediante la comparación de las respuestas amperométricas obtenidas al implementar los protocolos de modificación de las MBs y el ensayo de afinidad en ausencia y presencia de antibiótico. Los resultados obtenidos demostraron que en presencia de 167 ng mL^{-1} de PENG la intensidad de corriente registrada fue aproximadamente diez veces inferior a la obtenida en ausencia de antibiótico, poniendo de manifiesto la viabilidad del ensayo competitivo directo propuesto para la determinación de antibióticos β -lactámicos.

4.1.3.1 Optimización de las variables experimentales

A diferencia de los ensayos realizados en el desarrollo de los magnetoinmunosensores comentados en los apartados anteriores, para el magnetobiosensor de afinidad que implica el uso de HisTag-MBs, se usaron las disoluciones reguladoras B&W y P&D recomendadas para el uso de este tipo de partículas y el enlace de proteínas modificadas con un *tag* de histidinas mediante formación de complejos de coordinación [Life Tech. Corp., 2013^b].

En primer lugar se evaluó la posible existencia de adsorciones inespecíficas del trazador enzimático sobre la superficie de las HisTag-MBs, para lo que se compararon las respuestas amperométricas obtenidas a -200 mV tras incubar HisTag-MBs sin modificar y modificadas con PBP en disoluciones de PENG-HRP (preparadas en disolución reguladora P&D). Aunque las respuestas amperométricas eran diez veces inferiores en ausencia de PBP, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la presencia de adsorciones inespecíficas del trazador enzimático sobre MBs sin modificar. Con objeto de minimizar estas adsorciones inespecíficas se compararon las señales amperométricas obtenidas en presencia y ausencia de PBP trabajando en medios suplementados con BSA al 5 % (p/v) y NaCl 1.0 M, así como en disoluciones de leche diluida con P&D (1:1). Como se observa en la **Figura 4.19**, en los medios suplementados con BSA y NaCl se obtenía una relación entre señales específicas e inespecíficas dos veces superior a la encontrada en disolución reguladora P&D. Sin embargo, la mayor relación se obtuvo trabajando en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con P&D, lo que puede atribuirse a la minimización de las adsorciones inespecíficas del trazador enzimático debida a los componentes intrínsecos de la propia matriz láctea, resultados que han sido también observados y descritos previamente por otros autores [Setford, 1999].

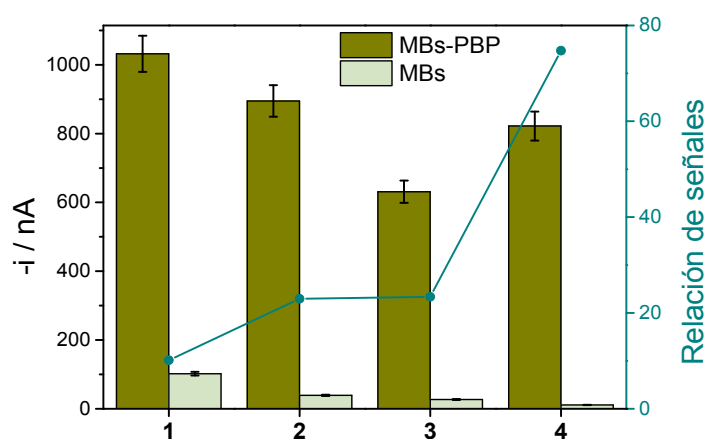


Figura 4.19. Comparación entre las respuestas amperométricas obtenidas tras incubar HisTag-MBs modificadas (específicas) o sin modificar (inespecíficas) con PBP en disoluciones de PENG-HRP preparadas en: **1)** P&D; **2)** P&D suplementado con BSA al 5 % (p/v); **3)** P&D suplementado con NaCl 1.0 M y **4)** disoluciones de leche entera UHT diluida con P&D (1:1). $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones entre las respuestas específicas e inespecíficas obtenidas.

Una vez minimizadas las adsorciones inespecíficas se procedió a la optimización de todas las variables experimentales implicadas en la preparación y funcionamiento del biosensor de afinidad, tomando como criterio de selección la mejor relación entre las respuestas amperométricas obtenidas para disoluciones de PENG-HRP preparadas en ausencia de antibiótico libre y en presencia de una determinada cantidad de analito.

Cantidad de partículas magnéticas

Para optimizar la cantidad de HisTag-MBs se varió el volumen tomado de la suspensión comercial entre 1.0 y 7.0 μL (correspondientes a una cantidad de MBs comprendida entre 40 – 280 μg). Estas HisTag-MBs se modificaron mediante incubación durante 20 min y a 25 $^{\circ}C$ en 100 μL de una disolución de PBP 50 $\mu g\ mL^{-1}$ en B&W. A continuación, tras los lavados correspondientes, las MBs-PBP se incubaron en 100 μL de PENG-HRP (dilución 1/100) en disolución reguladora P&D conteniendo PENG 0 ó 0.1 μM , durante 30 min a 25 $^{\circ}C$ y se procedió

a la medida amperométrica. Los resultados obtenidos (**Figura 4.20**) demostraron que la relación entre las señales amperométricas medidas en ausencia y en presencia de PENG aumentaba con la cantidad de MBs hasta un volumen de 3.0 μL , disminuyendo para cantidades superiores de MBs debido posiblemente, como se ha comentado en capítulos anteriores, a un aumento en la resistencia a la transferencia electrónica para elevadas cantidades de MBs, por lo que para experimentos posteriores se seleccionó como cantidad óptima 3.0 μL de la suspensión comercial (120 μg).

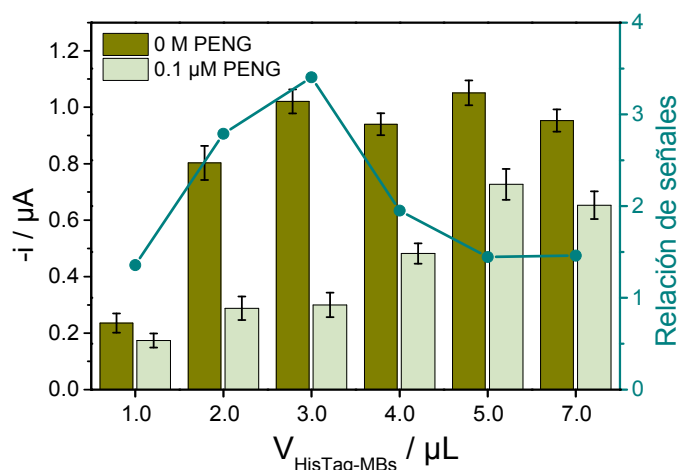


Figura 4.20. Respuestas amperométricas obtenidas a -200 mV (vs. Ag) tras incubar diferentes volúmenes de HisTag-MBs modificadas con PBP en disoluciones de PENG-HRP preparadas en P&D, conteniendo 0 ó 0.1 μM de PENG. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones entre las respuestas amperométricas obtenidas.

En comparación con los gráficos de optimización obtenidos para ProtG-MBs en el desarrollo de los magnetoinmunosensores para tetraciclinas (**Figura 4.2**) y sulfonamidas (**Figura 4.13**), la disminución en la relación entre las señales amperométricas debida al aumento en la resistencia a la transferencia electrónica ocurre para volúmenes inferiores de la suspensión de partículas de HisTag-MBs. Este hecho puede explicarse teniendo en cuenta la mayor concentración de la suspensión comercial de HisTag-MBs frente a la de ProtG-MBs (40 vs. 30 mg mL^{-1} , respectivamente), así como por las menores dimensiones de dichas partículas ($\varnothing 1 \mu\text{m}$) en comparación con las ProtG-MBs ($\varnothing 2.8 \mu\text{m}$), lo que se traduce en un mayor bloqueo superficial del electrodo de trabajo, dificultando la transferencia electrónica.

Modificación de las HisTag-MBs con PBP

Se optimizó la concentración de la proteína recombinante con la que se modificaron las HisTag-MBs. Para ello se prepararon diferentes magnetosensores variando la concentración de la disolución de PBP en la que se incubaban las partículas magnéticas entre 0 y 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como se observa en la **Figura 4.21** la relación entre las señales amperométricas obtenidas tras incubar las MBs-PBP en disoluciones de PENG-HRP aumentó con la concentración de PBP hasta 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$, disminuyendo drásticamente para concentraciones superiores a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, debido posiblemente a la aglutinación de proteína a elevadas concentraciones de la misma. De acuerdo con estos resultados, se eligió una concentración de PBP de 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para la modificación de las HisTag-MBs. Se optimizó también el tiempo requerido para la inmovilización, variando la duración de la etapa de incubación entre 5 y 20 min. Los mejores resultados se obtuvieron empleando tiempos de incubación de 10 min.

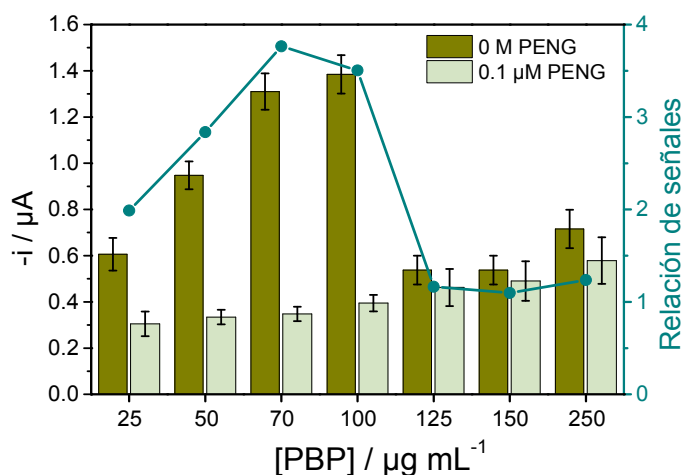


Figura 4.21. Respuestas amperométricas obtenidas a -200 mV (vs. Ag) tras incubar HisTag-MBs modificadas con disoluciones de PBP de diferentes concentraciones en disoluciones de PENG-HRP preparadas en P&D, conteniendo PENG 0 ó $0.1 \mu\text{M}$. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones entre las respuestas amperométricas obtenidas.

Etapa de competición: Trazador enzimático

Para optimizar la concentración del trazador enzimático PENG-HRP utilizado, y dado que la casa comercial suministradora no proporciona la concentración de este reactivo, se trabajó con diluciones del mismo. Así, se estudiaron las respuestas amperométricas obtenidas trabajando con diluciones de PENG-HRP comprendidas entre $1/100$ y $1/25$. La relación entre las señales amperométricas obtenidas en ausencia de PENG libre y en presencia de PENG $0.1 \mu\text{M}$ (**Figura 4.22**) aumentó significativamente con la concentración del trazador enzimático hasta una dilución $1/50$, por lo que se eligió ésta para estudios posteriores. El tiempo de incubación de la etapa de competición se varió entre 10 y 45 min, obteniéndose las mayores respuestas amperométricas para 30 min.

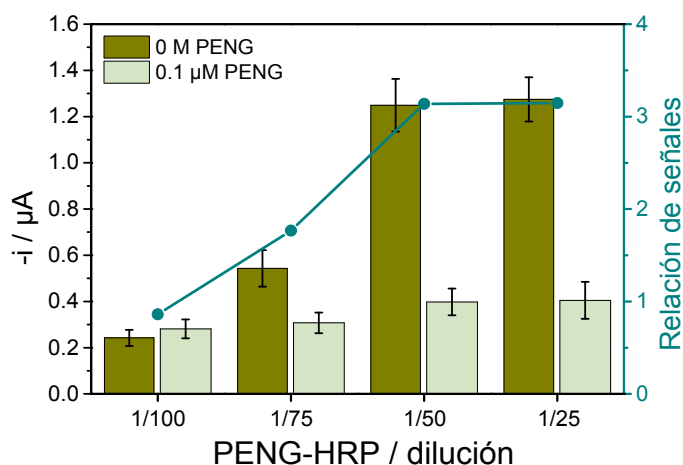


Figura 4.22. Respuestas amperométricas obtenidas tras incubar HisTag-MBs modificadas con PBP en disoluciones de PENG-HRP de diferente concentración preparadas en P&D, conteniendo PENG 0 ó $0.1 \mu\text{M}$. $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones entre las respuestas amperométricas obtenidas.

4.1.3.2 Características analíticas del magnetosensor de afinidad

En las condiciones optimizadas descritas anteriormente, se registraron las respuestas amperométricas obtenidas tras incubar las MBs-PBP en disoluciones de PENG-HRP preparadas en P&D suplementado con NaCl 1.0 M y conteniendo diferentes concentraciones de PENG. La curva de calibrado correspondiente se muestra en la **Figura 4.23**. Mediante el ajuste sigmoideal de esta curva de calibrado, se obtuvo un ID comprendido entre 2.3 y 57.3 ng mL⁻¹, un IC₅₀ de 11.9 ng mL⁻¹ y un LD de 0.93 ng mL⁻¹, aproximadamente cuatro veces inferior al LMR establecido para PENG por la legislación Europea.

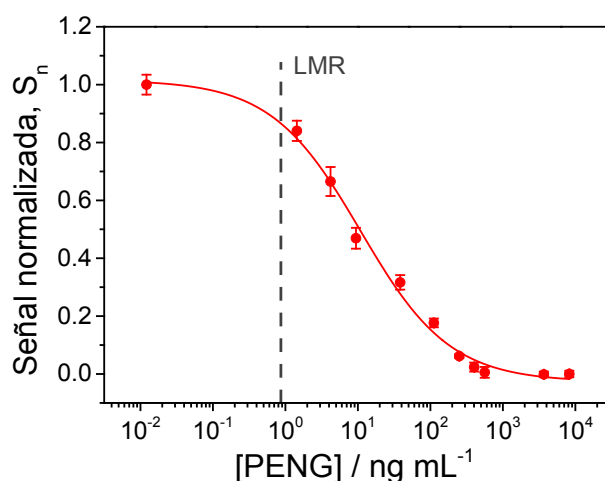


Figura 4.23. Curva de calibrado obtenida con el magnetosensor de afinidad desarrollado para PENG en disoluciones de P&D suplementado con NaCl 1.0 M y conteniendo PENG-HRP. $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se indica el LMR establecido en leche por la legislación Europea.

4.1.3.3 Características analíticas del magnetosensor de afinidad en leche

Se evaluó la aplicabilidad del magnetosensor de afinidad desarrollado en el análisis de muestras de leche entera UHT sin diluir o diluidas 1:1 con P&D conteniendo PENG. En este caso no fue necesario suplementar las disoluciones con NaCl 1.0 M, debido a que las propiedades bloqueantes de los componentes de la matriz láctea minimizan las adsorciones inespecíficas del trazador enzimático (ver **Figura 4.19**). La curva de calibrado obtenida para disoluciones de leche conteniendo diferentes concentraciones de PENG y diluidas con P&D (1:1) proporcionó un ID comprendido entre 12.1 y 90.9 ng mL⁻¹, un IC₅₀ de 35 ng mL⁻¹ y un LD de 4 ng mL⁻¹. En la **Tabla 4.4** se resumen las características analíticas obtenidas a partir de las diferentes curvas de calibrado para PENG. Como puede verse, en disoluciones de leche entera sin diluir se obtuvo un LD de 24 ng mL⁻¹, por lo que sólo es posible la detección de residuos de PENG al LMR establecido por la legislación con el biosensor de afinidad cuando se trabaja con muestras de leche entera UHT diluidas (1:1) con la disolución reguladora P&D.

Tabla 4.4. Comparación de las características analíticas de las curvas de calibrado construidas para PENG en diferentes matrices con el magnetosensor de afinidad desarrollado.

PENG	Leche UHT entera		P&D (con NaCl 1.0 M)
	sin diluir	dilución 1:1 con P&D	
r^2	0.995	0.997	0.997
IC_{50} / ng mL ⁻¹	63 ± 7	35 ± 4	12 ± 2
ID / ng mL ⁻¹	33.3 a 119.7	12.1 a 90.9	2.3 a 57.3
LD / ng mL ⁻¹	24 ± 6	4 ± 1	0.9 ± 0.2

De acuerdo al reglamento establecido por la Unión Europea relativo al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados [EC 657/2002], se calcularon en este caso el límite de decisión y la capacidad de detección. Así, en sustancias para las que se ha establecido un límite máximo permitido, como es el caso de los residuos de antibióticos en leche, estos parámetros se definen de la siguiente manera: el límite de decisión o **CC α** indica el límite en el cual y a partir del cual se puede concluir (con una probabilidad de error α) que una muestra no está conforme con los límites regulados. La capacidad de detección o **CC β** indica el contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado o cuantificado (con una probabilidad de error β), es decir, la concentración en la que un método puede detectar límites de concentración permitidos con una certeza estadística de $1-\beta$. Tras el cálculo de estos parámetros, según se describe en el *Apartado 3.5.2*, se obtuvieron valores de 6.3 y 7.7 ng mL⁻¹ para los parámetros CC α y CC β , respectivamente.

Se evaluó la especificidad del magnetosensor de afinidad, construyendo curvas de calibrado, para otros cinco antibióticos β -lactámicos habitualmente usados, en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con disolución reguladora P&D. Las curvas de calibrado obtenidas se muestran en la **Figura 4.24** y las características analíticas derivadas de las mismas se resumen en la **Tabla 4.5**. Como puede observarse todos los antibióticos analizados fueron significativamente reconocidos con el magnetosensor de afinidad y los valores de reactividad cruzada estimados permitieron concluir que la PBP empleada presenta un reconocimiento similar para la mayoría de los antibióticos estudiados.

Tabla 4.5. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas con el magnetosensor desarrollado para diferentes antibióticos β -lactámicos en leche entera UHT diluida 1:1 con P&D. Los porcentajes de reactividad cruzada (%RC) se estimaron de acuerdo a la *Ecuación (4)*.

	PENG	AMOX	AMP	CEF	OXA	CLOX
r^2	0.997	0.996	0.995	0.995	0.997	0.996
IC_{50} / ng mL ⁻¹	35 ± 4	30 ± 4	46 ± 6	44 ± 6	44 ± 6	87 ± 11
ID / ng mL ⁻¹	12.1 a 90.9	19.3 a 47.3	23.0 a 88.4	14.2 a 123.1	19.8 a 108.5	32.8 a 231.5
LD / ng mL ⁻¹	4 ± 1	14.1 ± 0.6	14.0 ± 0.7	6.6 ± 0.2	13.6 ± 0.4	19.5 ± 0.3
LMR / μ g kg ⁻¹	4.0	4.0	4.0	60	30	30
%RC	100	119	80	97	90	50

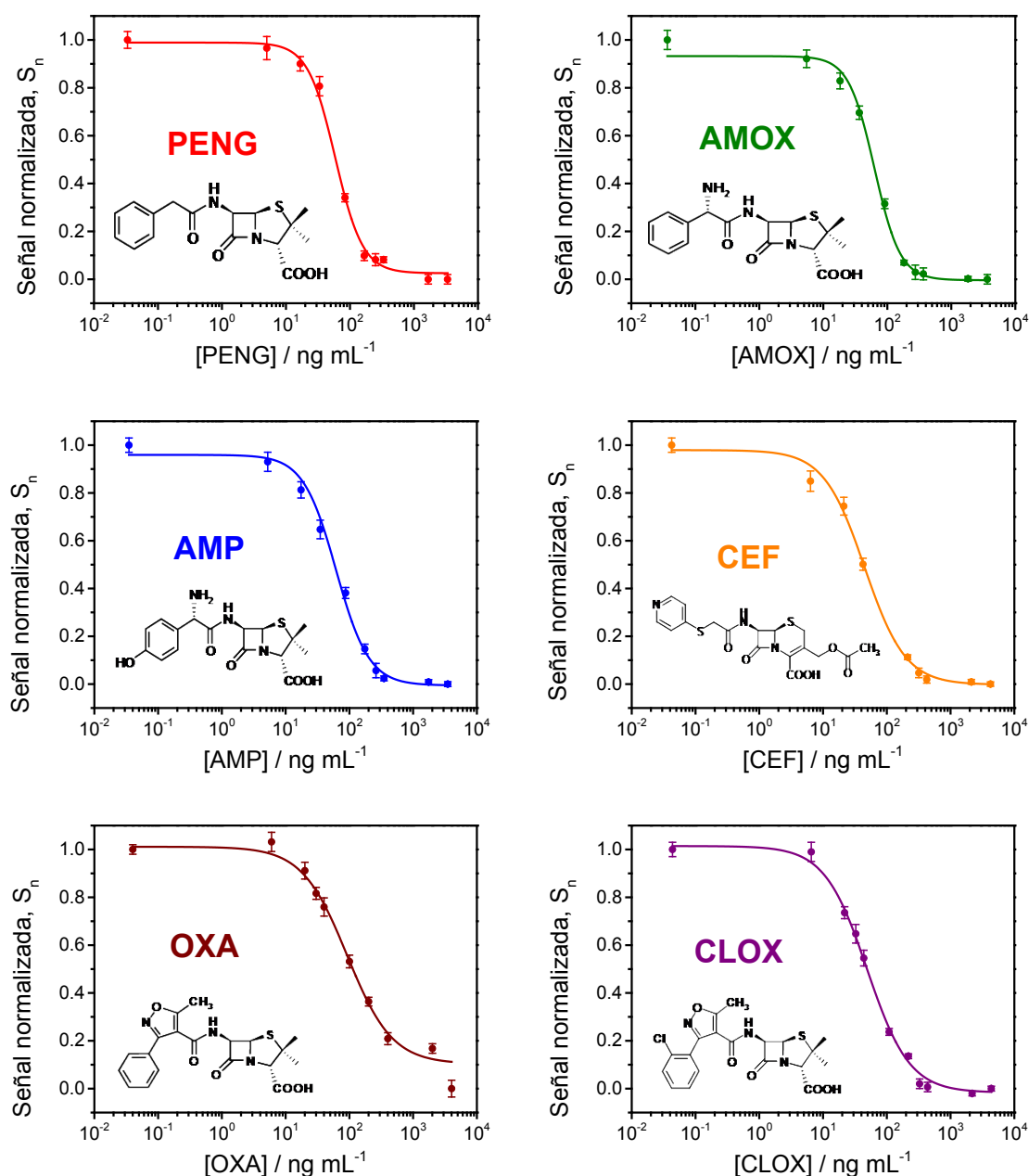


Figura 4.24. Curvas de calibrado obtenidas con el magnetosensor de afinidad desarrollado para diferentes antibióticos β -lactámicos (PENG, AMOX, AMP, CEF, OXA, CLOX) en leche entera UHT diluida 1:1 con P&D. $E_{ap} = -200 \text{ mV}$ (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$).

La reproducibilidad de las medidas se estudió preparando diferentes magnetosensores el mismo día y en días diferentes y comparando las respuestas amperométricas obtenidas tras la incubación de las MBs-PBP en disoluciones de PENG-HRP en ausencia de antibiótico, preparadas en leche entera UHT diluida 1:1 con disolución reguladora P&D. Se obtuvieron valores de RSD del 5.1 y 6.6 % para los magnetosensores preparados el mismo día ($n=5$) y en días diferentes ($n=6$), respectivamente. Estos resultados demostraron que todos los procedimientos implicados en la determinación de antibióticos con el magnetosensor, incluyendo la modificación de las partículas magnéticas, la captura magnética de las mismas sobre SPCEs y la medida

electroquímica, son fiables y permiten obtener respuestas amperométricas reproducibles a partir de diferentes magnetosensores contruidos de la misma manera.

Se comprobó también la reproducibilidad de las medidas obtenidas usando tres lotes diferentes de la PBP recombinante sintetizada para la modificación de las MBs, obteniéndose una RSD del 3.9 %, lo que demostró también la robustez de los protocolos de hiperexpresión y purificación de la proteína recombinante.

La estabilidad de las partículas modificadas con la PBP se evaluó preparando el mismo día diferentes conjugados MBs-PBP y almacenándolos a 4 °C en disolución reguladora P&D. Cada día de control, dos de estos conjugados se incubaron en disoluciones de PENG-HRP (preparadas en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con P&D) en ausencia de antibiótico libre o en presencia de PENG 0.5 μ M, procediendo posteriormente a su medida amperométrica. Se construyó un gráfico de control, tomando como valor central el valor medio de cinco medidas obtenidas el primer día del estudio. Los límites de control superior e inferior se establecieron como el triple de la desviación estándar de estas cinco medidas. Como se observa en la **Figura 4.25**, las respuestas obtenidas, tanto en ausencia como en presencia de antibiótico libre, permanecieron dentro de los límites de control durante 9 días, confirmando una adecuada estabilidad de los conjugados MBs-PBP.

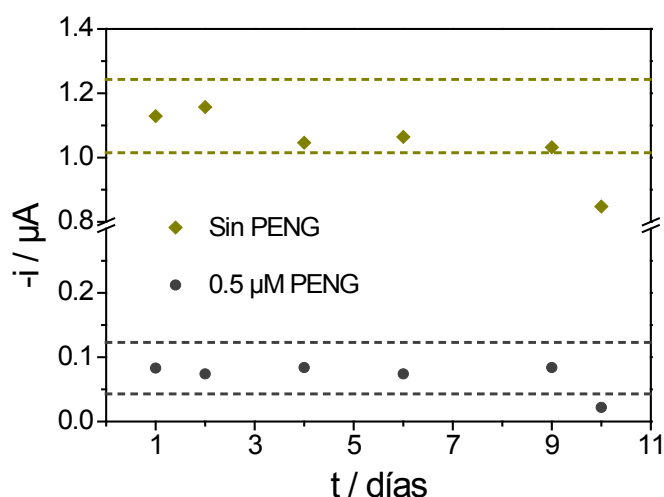


Figura 4.25. Gráfico de control construido para el estudio de la estabilidad de los conjugados MBs-PBP almacenados en P&D a 4 °C. Las señales corresponden a las medidas amperométricas registradas a -200 mV (vs. Ag), tras la incubación de estos conjugados en disoluciones de PENG-HRP preparadas en leche: P&D (1:1) en ausencia o presencia de PENG.

Se realizó un experimento similar almacenando los conjugados obtenidos tras su incubación en disoluciones de PENG-HRP (MBs-PBP-PENG-HRP). Las señales amperométricas obtenidas a partir de estos conjugados mantuvieron el 95, 81 y 52 % de la señal amperométrica original después de 24, 48 y 120 h de almacenamiento a 4 °C en disolución reguladora P&D, respectivamente. Estos resultados concuerdan con la estabilidad reportada para los complejos β -lactama-PBP, con una vida media de entre 24 y 54 h [Lu, 2001].

4.1.3.4 Selectividad del magnetosensor de afinidad

Para evaluar la selectividad del magnetosensor desarrollado, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia y en presencia de tres antimicrobianos pertenecientes a otras familias de antibióticos (SPY, TC y ENRO) y potencialmente interferentes por encontrarse comúnmente en la leche y los productos lácteos. Para cada antibiótico se ensayaron dos niveles de concentración (250 nM y 10 μ M) en disoluciones de leche entera UHT:P&D (1:1). Los resultados que se muestran en la **Figura 4.26**, demostraron que no se producía un reconocimiento importante para los antibióticos potencialmente interferentes incluso en presencia de una concentración elevada de los mismos, resultando en todos los casos valores de reactividad cruzada inferiores al 1 %.

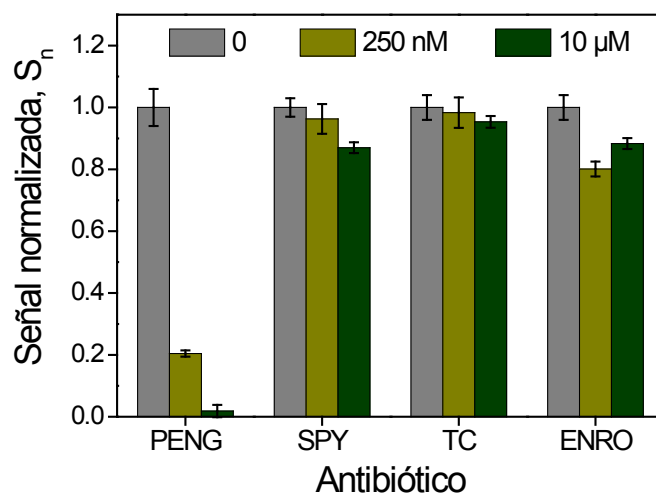


Figura 4.26. Estudio de la selectividad de la PBP empleada frente a tres antibióticos potencialmente interferentes (SPY, TC y ENRO). Se muestran las señales amperométricas obtenidas a -200 mV (vs. Ag), tras incubar las MBs-PBP en disoluciones de PENG-HRP preparadas en leche entera UHT:P&D (1:1), en ausencia de antibióticos y conteniendo SPY, TC o ENRO a dos niveles de concentración. A modo de comparación se muestran también las señales obtenidas para PENG. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$).

4.1.3.5 Respuesta a la forma activa de los antibióticos

Un aspecto importante a tener en cuenta en el desarrollo de sensores para la determinación de antibióticos β -lactámicos es el hecho de que los LMRs establecidos por la legislación están definidos para especies que no han sufrido la hidrólisis de su anillo β -lactámico [Gustavsson, 2002^a]. Debido a esto, se debe evaluar también la especificidad del biosensor frente a especies hidrolizadas. Utilizando el esquema propuesto, se comprobó que el magnetosensor desarrollado sólo era sensible a la forma activa de los antibióticos, para lo que se analizaron diferentes disoluciones de leche contaminadas con PENG o CEF a un nivel de concentración 0.5μ M antes y después de realizar la hidrólisis de estos antibióticos de acuerdo al protocolo descrito en el *Apartado 3.4.13*. A modo de ejemplo, en la **Figura 4.27** se muestran las señales amperométricas obtenidas para PENG, en la que se observa que los residuos hidrolizados no fueron reconocidos por la proteína recombinante empleada como receptor biológico en el magnetobiosensor de afinidad desarrollado.

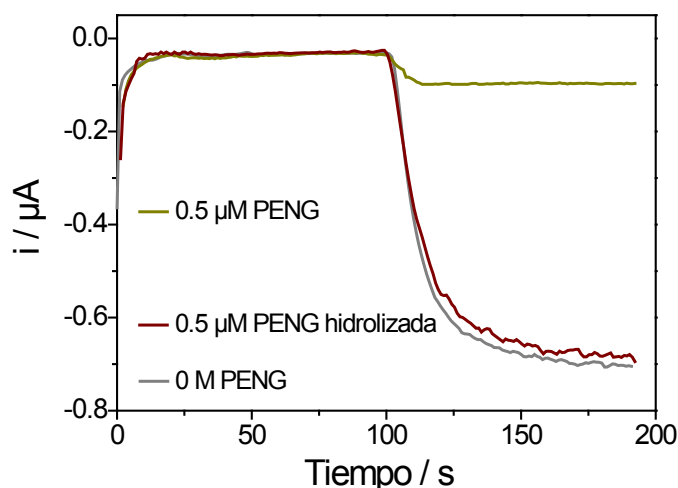


Figura 4.27. Respuestas amperométricas obtenidas a -200 mV (vs. Ag) con el magnetosensor de afinidad para disoluciones de leche diluida 1:1 con P&D, en ausencia de antibiótico libre y en presencia de PENG $0.5 \mu\text{M}$ antes y después de su hidrólisis.

4.1.3.6 Determinación de antibióticos en leche

La utilidad del magnetosensor desarrollado se evaluó analizando disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con disolución reguladora P&D y conteniendo PENG a cuatro niveles de concentración diferentes: 18, 50, 100 y 200 nM (equivalentes a 6.3, 17.8, 35.6 y 71.2 ng mL^{-1} , respectivamente). La determinación de la concentración de PENG en cada una de las muestras analizadas se realizó por interpolación de los valores de corriente medidos en la curva de calibrado construida en la misma matriz para este antibiótico (**Figura 4.24**). Se analizaron cinco muestras de leche para cada nivel de concentración obteniéndose los resultados que se recogen en la **Tabla 4.6**.

Tabla 4.6. Resultados obtenidos en la determinación de PENG a diferentes niveles de concentración en disoluciones de leche entera UHT diluida con P&D (1:1).

[PENG] adicionada / nM	18	50	100	200
[PENG] encontrada / nM	18 ± 2	52 ± 6	98 ± 8	210 ± 20
Recuperación / %	99 ± 12	105 ± 12	98 ± 8	108 ± 8
RSD / %	9.4	9.6	6.2	5.8

Los resultados obtenidos demostraron la utilidad del magnetosensor de afinidad desechable para la determinación de residuos de antibióticos β -lactámicos, en un tiempo de aproximadamente 30 min (una vez preparadas las MBs-PBP) y tras una simple dilución de la muestra.

Con objeto de intentar disminuir el LD obtenido se llevó a cabo el ensayo en dos etapas: una primera incubación durante 30 min de las MBs-PBP con la muestra de leche en presencia del antibiótico a determinar y una posterior etapa de incubación de 30 min con el trazador enzimático en la que únicamente la PBP no complejada durante el proceso de incubación anterior se enlazó al trazador enzimático. Las respuestas amperométricas obtenidas para disoluciones de leche conteniendo 4 ng mL^{-1} de PENG, AMOX o AMP fueron el 85, 84 y 74 % de

las señales amperométricas obtenidas en ausencia de antibióticos, respectivamente, demostrando la posibilidad de diferenciar claramente entre muestras de leche libres de antibióticos y conteniendo sólo 4 ppb de PENG, AMOX o AMP, presentándose este ensayo en dos etapas como una herramienta útil para fines de cribado de muestras.

4.1.3.7 Conclusiones

Se desarrolló un magnetosensor amperométrico de afinidad para la detección específica y sensible en leche de los antibióticos correspondientes a la familia de las β -lactamas mediante la inmovilización estable y orientada de una proteína fijadora de penicilina recombinante. Aprovechando que los complejos de metales de transición con el ácido nitrilotriacético se usan comúnmente en cromatografía de afinidad metal-ligando para la retención selectiva de proteínas modificadas con un *tag* de histidinas, la PBP empleada, clonada con este *tag*, se inmovilizó sobre partículas magnéticas comerciales desarrolladas para este tipo de inmovilización.

Se demostró que el uso de proteínas microbianas recombinantes como elementos de biorreconocimiento frente a antibióticos β -lactámicos, proporciona diversas ventajas:

- Permite el reconocimiento exclusivo del anillo β -lactámico intacto, no presentando interacción con las formas abiertas o hidrolizadas, lo que es de gran importancia en el cumplimiento de la legislación vigente.
- Son sensibles tanto a cefalosporinas como a penicilinas, ambas pertenecientes a la familia de los antibióticos β -lactámicos.
- Su producción es fiable, reproducible y de coste asequible en cantidades necesarias para su comercialización.

La metodología desarrollada demostró ser capaz de detectar bajos niveles de residuos de antibióticos de una manera fiable y rápida en leche, sin necesidad de aplicar tratamientos de muestra complejos. Aunque la detección de residuos de PENG, AMP y AMOX a los LMRs establecidos por la legislación sólo es factible de modo cualitativo y en un ensayo en dos etapas, la determinación cuantitativa de estas especies y de otros antimicrobianos pertenecientes a la misma familia de antibióticos a concentraciones ligeramente superiores sí fue posible en un tiempo de análisis de 30 min.

4.2 Biosensores integrados

4.2.1 Determinación de sulfonamidas

Se ha puesto a punto un inmunosensor amperométrico integrado para la determinación de residuos de antibióticos pertenecientes a la familia de las sulfonamidas en leche. El inmunosensor emplea electrodos serigrafiados de carbono sobre los que se inmoviliza covalentemente un anticuerpo con amplia especificidad frente a los antibióticos de la familia de las sulfonamidas (ver **Figura 4.28**). La cuantificación se logra mediante un ensayo de tipo competitivo directo entre las sulfonamidas presentes en la muestra y un trazador enzimático, un análogo de sulfonamida marcado con la enzima peroxidasa (SPY-HRP), estableciéndose una competición entre estas dos especies por los sitios de reconocimiento de los anticuerpos inmovilizados. La detección electroquímica se realiza empleando HQ como mediador redox y H_2O_2 como sustrato enzimático.

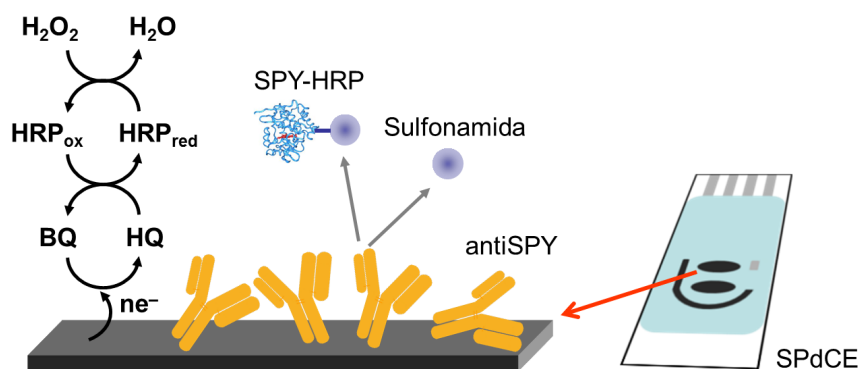


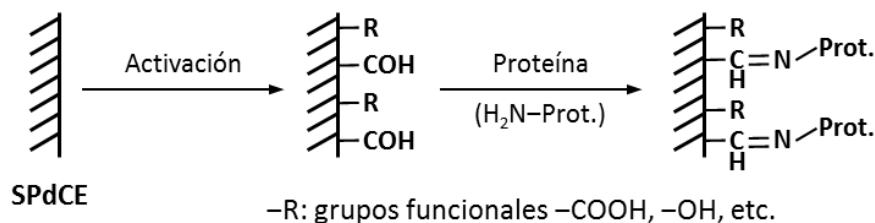
Figura 4.28. Representación esquemática del inmunosensor desarrollado para la determinación de sulfonamidas. Los anticuerpos se inmovilizan covalentemente sobre la superficie electródica y se establece una competición entre las sulfonamidas y el trazador enzimático por los sitios de unión de los anticuerpos inmovilizados.

4.2.1.1 Optimización de la inmovilización de los anticuerpos

Con vistas a la posible obtención de sistemas multidetección mediante una integración de varios sistemas biosensores, el desarrollo de biosensores integrados para la determinación de antibióticos se realizó empleando electrodos serigrafiados duales de carbono (SPdCEs).

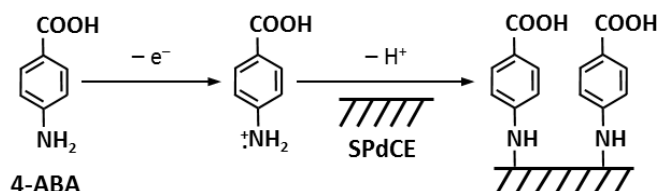
Con objeto de desarrollar los sistemas sensores más sensibles y reproducibles, se estudiaron en primer lugar diversos protocolos para la inmovilización de proteínas sobre superficies electródicas de carbono. Dichos protocolos se evaluaron mediante la inmovilización de la enzima peroxidasa y de un anticuerpo selectivo que reconoce esta enzima. Las estrategias seguidas fueron (para detalles adicionales sobre los protocolos *b*), *c*) y *d*), ver *Apartado 3.4.4*):

- Adsorción de la enzima sobre la superficie electródica, sin aplicar ningún tratamiento previo a la misma.
- Inmovilización sobre electrodos activados a intensidad de corriente constante, según el protocolo descrito en [Hernández-Santos, 2004; Díaz-González, 2005].
- Formación de enlaces covalentes mediante la generación previa de grupos aldehído en la superficie de carbono, según el protocolo descrito en [Xu, 2010]. Como se observa en el **Esquema 4.1**, la generación de estos grupos permite la inmovilización covalente de proteínas mediante una reacción de base de Schiff entre los grupos -NH_2 de la proteína y los grupos -CHO generados *in situ*.



Esquema 4.1. Etapas implicadas en la inmovilización de proteínas mediante la generación de grupos aldehído en la superficie electródica.

- Inmovilización por formación de enlaces covalentes a través de grupos carboxilo generados por funcionalización de la superficie electródica con radicales amino del 4-ABA, según un protocolo adaptado de [Liu, 2000] y activados posteriormente con EDC y Sulfo-NHS. Como se observa en el **Esquema 4.2**, la oxidación del grupo amino del 4-ABA genera su radical catiónico y permite la funcionalización de la superficie electródica.



Esquema 4.2. Etapas implicadas en la funcionalización de la superficie del SPdCE con 4-ABA.

Tras el pretratamiento aplicado en cada caso, se depositaron sobre cada electrodo de trabajo 5 μL de una disolución de HRP de 2.4 mg mL^{-1} ($\sim 0.4 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$), se incubó toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$ en atmósfera húmeda y se lavó con agua desionizada. Los sensores así preparados se utilizaron para la determinación de H_2O_2 mediante amperometría en disoluciones agitadas, a un potencial aplicado de -200 mV (frente al electrodo de pseudoreferencia de Ag del SPdCE) en 10 mL de disolución reguladora de fosfato (pH 7.0) que contiene HQ 1 mM como mediador redox. Una vez estabilizada la corriente de fondo, se realizaron adiciones de H_2O_2 en concentraciones comprendidas entre 20 y 100 μM . Las pendientes de los calibrados obtenidos con los sensores preparados siguiendo los diferentes protocolos de inmovilización se muestran en la **Figura 4.29**. Como se observa, la simple adsorción de HRP sobre la superficie electródica proporcionó una medida bastante irreproducible, además de una sensibilidad inferior atribuible

a una menor cantidad de enzima inmovilizada en comparación con los demás protocolos. A la vista de estos resultados, este protocolo de inmovilización se descartó para desarrollos posteriores.

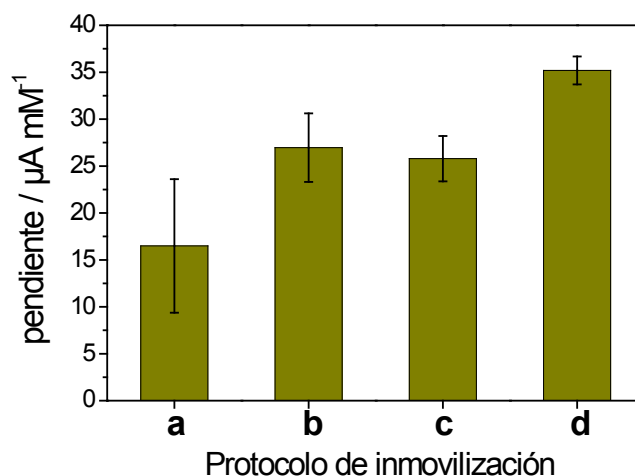
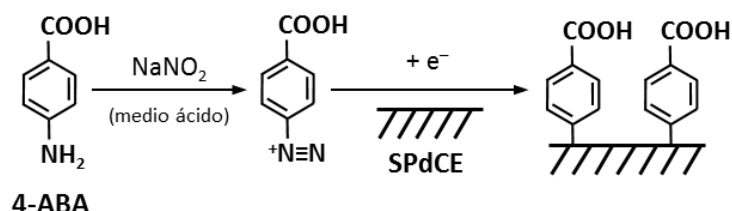


Figura 4.29. Comparación de las pendientes obtenidas para la determinación amperométrica de H_2O_2 con los biosensores fabricados inmovilizando la enzima HRP mediante: **a)** adsorción; **b)** activación de las superficies electródicas a intensidad de corriente constante; **c)** enlace covalente a través de grupos $-\text{CHO}$ generados en la superficie electródica; **d)** enlace covalente a grupos $-\text{COOH}$ generados en la superficie electródica tras su funcionalización con 4-ABA. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=4$).

Se estudió a continuación el efecto del protocolo de inmovilización en el reconocimiento antigénico de un anticuerpo frente a HRP (antiHRP). Este estudio permitió también evaluar los efectos de las posibles adsorciones inespecíficas de la enzima HRP en la fabricación de inmunosensores. Además de los protocolos ensayados anteriormente se evaluó también la inmovilización de anticuerpos sobre superficies de carbono nanoestructuradas con nanopartículas de oro según el protocolo descrito en [Escamilla-Gómez, 2009] (ver *Apartado 3.4.4*). Las nanopartículas de oro han sido ampliamente utilizadas para la inmovilización de anticuerpos y otras proteínas debido a que proporcionan un microambiente similar al de las proteínas en su estado nativo, lo que les permite retener su actividad biológica [He, 2007; Pingarrón, 2008].

Por otra parte, el protocolo de funcionalización de la superficie electródica con radicales amino del 4-ABA se comparó con la funcionalización obtenida a través de la generación de sales de diazonio del 4-ABA mediante la reducción electroquímica de cationes de diazonio aromáticos, como se observa en el **Esquema 4.3**.



Esquema 4.3. Funcionalización de la superficie electródica a través de la reacción de diazotación del 4-ABA, que permite la generación de su sal de diazonio, y la posterior reducción de la misma.

Se han propuesto diversos procedimientos para la diazotación de residuos amino enlazados a anillos aromáticos, por lo que se han adaptado y comparado tres de ellos aplicados previamente en la modificación de electrodos de carbono para la fabricación de biosensores [Dequaire, 1999], [Liu, 2008] y [Ho, 2010] (protocolos detallados en *Apartado 3.4.4*).

Tras la aplicación de los diferentes protocolos y activación de los grupos --COOH con EDC y Sulfo-NHS en las superficies funcionalizadas con 4-ABA, se procedió a la inmovilización del anticuerpo, para lo que se depositaron sobre cada electrodo de trabajo 5 μL de una disolución de antiHRP de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, y se dejó incubar toda la noche (~ 16 h) a 4 $^{\circ}\text{C}$ en un ambiente húmedo. Posteriormente los electrodos se lavaron con PBST y se secaron bajo corriente de N_2 . Para estos estudios se emplearon electrodos serigrafados duales (SPdCE), modificando uno de los electrodos de trabajo con el anticuerpo y dejando el otro sin modificar para evaluar las posibles adsorciones inespecíficas del antígeno (HRP). Para el bloqueo de la superficie electródica se depositó una alícuota de 50 μL de una disolución de BSA al 2 % (p/v), cubriendo ambos electrodos de trabajo, se dejó incubar durante 1 h a temperatura ambiente y se lavó el electrodo con PBST. Por último se depositaron 50 μL de una disolución de HRP de 48 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (~ 8.0 U mL^{-1}) durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente se lavó el electrodo con PBST y se evaluó el reconocimiento antigénico mediante amperometría en disoluciones agitadas empleando HQ como mediador redox y H_2O_2 como sustrato enzimático.

Las señales amperométricas obtenidas con los inmunosensores preparados según los protocolos comentados anteriormente se muestran en la **Figura 4.30**. Se representan también las relaciones entre las señales específicas, correspondientes al reconocimiento inmunológico y las señales correspondientes a las adsorciones inespecíficas de la HRP en ausencia de antiHRP.

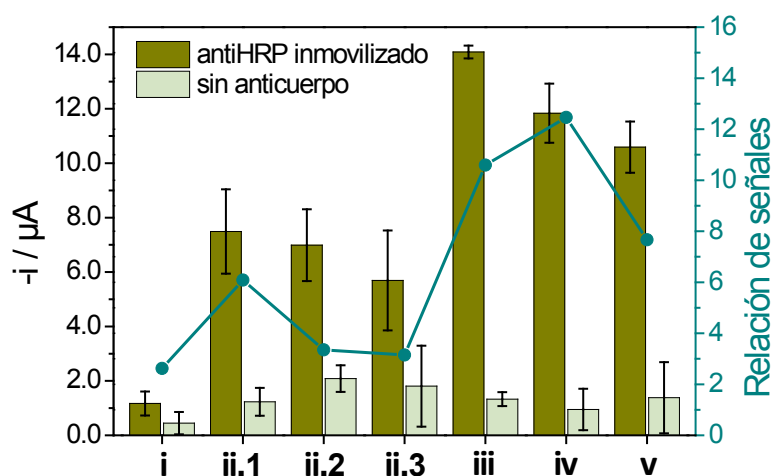


Figura 4.30. Comparación de las señales amperométricas obtenidas para inmunosensores de HRP fabricados inmovilizando antiHRP mediante: **i**) superficies nanoestructuradas con nanopartículas de Au; **ii**) enlace covalente a través de grupos --COOH tras la funcionalización de la superficie electródica con sales de diazonio del 4-ABA, protocolos adaptados de: **ii.1**) [Ho, 2010], **ii.2**) [Dequaire, 1999] y **ii.3**) [Liu, 2008]; **iii**) enlace covalente a través de grupos --COOH generados tras la funcionalización de la superficie con radicales amino del 4-ABA; **iv**) enlace covalente a través de grupos --CHO generados sobre la superficie electródica; **v**) activación de la superficie electródica a intensidad de corriente constante. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones entre las señales específicas y las debidas a adsorciones inespecíficas del antígeno.

Los resultados más satisfactorios se obtuvieron mediante los protocolos *iii* y *iv*, correspondientes a la inmovilización mediante enlace covalente por funcionalización con

radicales amino del 4-ABA y generación de grupos $-CHO$ en la superficie electródica, respectivamente. Aunque este último protocolo proporciona la mejor relación entre señales específicas e inespecíficas, la reproducibilidad del protocolo que emplea el 4-ABA es mejor, por lo que se eligió para la fabricación del inmunosensor.

4.2.1.2 Optimización de las variables experimentales

Una vez seleccionado un método de inmovilización de anticuerpos eficiente y suficientemente reproducible, se procedió al desarrollo de la plataforma sensora para la determinación de sulfonamidas, optimizando previamente las diferentes variables experimentales implicadas en la fabricación y funcionamiento del biosensor.

Funcionalización de la superficie electródica

Puesto que el 4-ABA es un análogo estructural de las sulfonamidas, en primer lugar se evaluó la posible interferencia de este compuesto en el reconocimiento de la SPY por el anticuerpo empleado. Para ello se compararon las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia y presencia de 4-ABA en disolución en un ensayo competitivo directo empleando una concentración fija de trazador enzimático SPY-HRP y diferentes concentraciones de SPY. Los resultados obtenidos mostraron que no había diferencias significativas entre las señales amperométricas obtenidas para las diferentes concentraciones de SPY en presencia y ausencia de 4-ABA en disolución, por lo que se pudo concluir que no había interferencia significativa del 4-ABA en el reconocimiento de la SPY por el antiSPY y que por tanto puede emplearse para la funcionalización de las superficies electródicas y posterior inmovilización covalente del anticuerpo sin afectar la eficiencia de la reacción inmunológica. Cabe destacar además que la funcionalización de las superficies de carbono con 4-ABA implica su enlace covalente a la superficie de carbono a través del grupo fenilamina quedando bloqueada parte de la estructura común a las sulfonamidas por lo que el reconocimiento de este compuesto por parte del anticuerpo, en caso de existir, estaría muy desfavorecido tras su anclaje a la superficie electródica.

Una vez comprobado esto, se optimizó el protocolo de funcionalización de la superficie electródica. En las optimizaciones previas los barridos voltamperométricos se realizaron entre 0.0 y 0.9 V (frente al electrodo de pseudoreferencia de Ag). Con objeto de estudiar la influencia de la ventana de potencial en los barridos realizados para la funcionalización de la superficie electródica, se realizaron barridos entre 0.0 y 1.2 V. Como se muestra en la **Figura 4.31**, se observó un pico de oxidación a aproximadamente 0.94 V correspondiente a la oxidación monoelectrónica del grupo amino del 4-ABA para formar su catión radical. Al realizar barridos sucesivos, la intensidad del pico disminuía gradualmente, confirmando el recubrimiento de la superficie electródica [Liu, 2000]. Sin embargo, al realizar barridos a potenciales superiores a 1.0 V se observó un considerable deterioro de la superficie del SPdCE, lo que se tradujo en una elevada irreproducibilidad de las señales amperométricas obtenidas, por lo que para sucesivos experimentos se decidió realizar barridos entre 0.0 y 1.0 V.

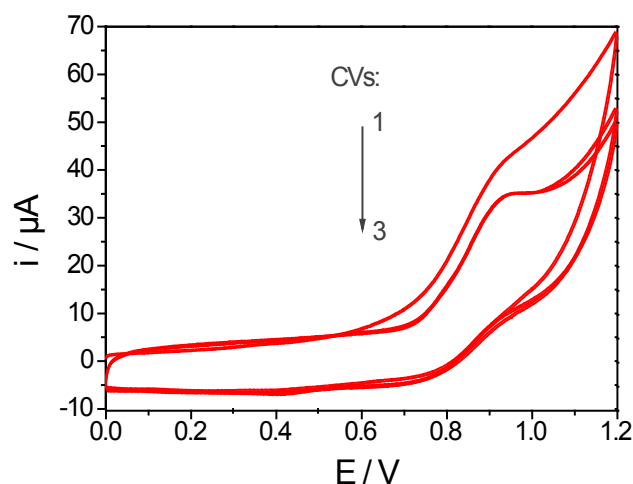


Figura 4.31. Barridos voltamperométricos sucesivos registrados entre 0.0 y 1.2 V a 10 mV s^{-1} , para la funcionalización de las superficies electródicas con 4-ABA. Medio: 4-ABA 3 mM y LiClO_4 0.1 M en EtOH absoluto.

La formación de la película de 4-ABA sobre las superficies electródicas se comprobó realizando barridos voltamperométricos en disoluciones de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ a diferentes valores de pH (**Figura 4.32**), confirmandose la presencia de los grupos carboxílicos en las superficies modificadas. Mientras que los voltamperogramas cíclicos obtenidos a valores de pH 3.0 y 4.0 mostraron gran reversibilidad, para valores de pH superiores se observó una disminución significativa en las corrientes de pico. Estos resultados están de acuerdo con la repulsión que existe entre el par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ y los grupos carboxílicos desprotonados $-\text{COO}^-$, comportamiento que ocurre a valores de pH superiores al valor de pK_a reportado para el 4-ABA en disolución ($\text{pK}_a = 4.6$, [Liu, 2000]). Es importante mencionar que no se observó diferencia entre los voltamperogramas registrados a los distintos valores de pH para superficies electródicas sin modificar.

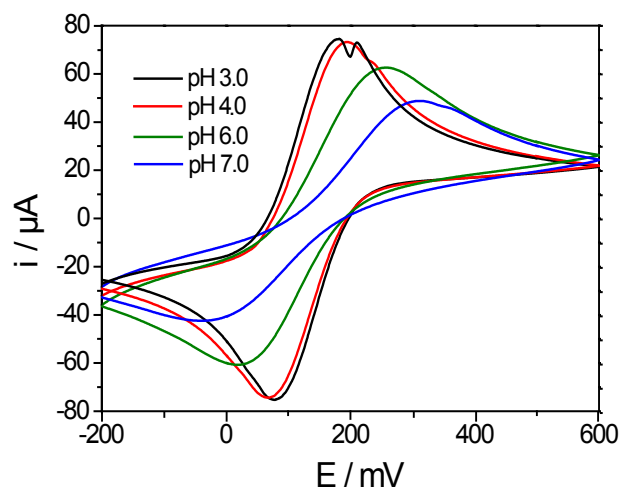


Figura 4.32. Voltamperogramas cíclicos obtenidos sobre 4-ABA-SPdCE en disoluciones de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (5 mM cada uno) a diferentes valores de pH. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Para la inmovilización covalente de proteínas sobre los electrodos funcionalizados, los grupos carboxílicos superficiales se activaron mediante el método de los ésteres activos con EDC y Sulfo-NHS, depositando una alícuota de esta mezcla de reactivos en disolución sobre la superficie modificada de los electrodos y dejando incubarse en atmósfera húmeda a temperatura ambiente. Se estudió el tiempo requerido para la activación de los grupos carboxílicos, variando dicho tiempo entre 0 y 60 min. Se observó un incremento de las señales analíticas obtenidas al aumentar el tiempo de incubación hasta 30 min, manteniéndose constantes las respuestas obtenidas para tiempos de hasta 40 min y disminuyendo para tiempos superiores. Para experimentos posteriores se eligió un tiempo de activación de 30 min.

La eficiencia de la inmovilización de los anticuerpos sobre la superficie de los electrodos serigrafados se evaluó monitorizando las etapas de modificación de los mismos mediante voltamperometría cíclica y EIS. En la **Figura 4.33a** se representan los voltamperogramas cíclicos obtenidos para el par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ para el electrodo sin modificar, tras su funcionalización con 4-ABA, después de la activación de los grupos carboxilo por el método de los ésteres activos y tras la inmovilización covalente del anticuerpo antiSPY. En la **Figura 4.33b** se representan los correspondientes diagramas de Nyquist obtenidos por EIS.

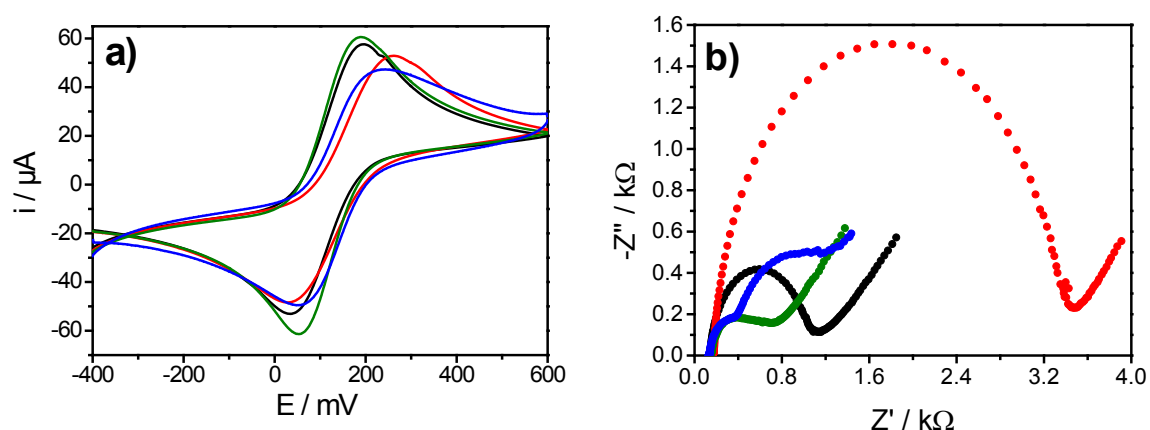
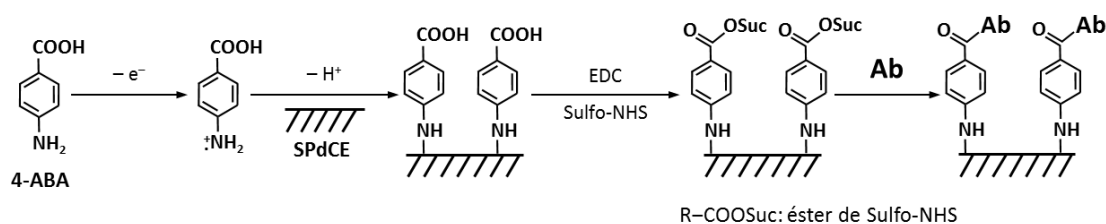


Figura 4.33. a) Voltamperogramas cíclicos y b) diagramas de Nyquist ($-Z''$ vs. Z') obtenidos en disolución reguladora de fosfato (pH 7.0) conteniendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ (5 mM cada uno): SPdCE sin modificar (—, ●); tras su funcionalización con 4-ABA (—, ●); después de la activación de los grupos carboxilo con EDC/Sulfo-NHS (—, ●); tras la inmovilización covalente de antiSPY (—, ●). CVs: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; EIS: intervalo de frecuencias de 0.01 Hz a 10 kHz, $V_{\text{rms}} = 10 \text{ mV}$.

Como era de esperar, debido a la repulsión electrostática comentada anteriormente entre el par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ y los grupos $-\text{COO}^-$, tras la modificación de la superficie electródica con 4-ABA se observó una disminución en la corriente de pico y un aumento en la separación de los potenciales de pico respecto al SPdCE sin modificar. Después de la activación del 4-ABA con EDC/Sulfo-NHS se observó un incremento en la corriente de pico, debido a la neutralización de la carga negativa de los grupos carboxilo al formarse el éster de succinimida. La posterior inmovilización del anticuerpo produjo un impedimento adicional al acceso del par redox ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$) a la superficie del electrodo, dando lugar a una disminución aún mayor de la corriente de pico. Estos resultados fueron consistentes con los valores de la resistencia a la transferencia electrónica obtenidos por EIS. La forma inusual obtenida para el diagrama de Nyquist registrado tras la inmovilización del anticuerpo se puede explicar por la existencia de dos capas diferentes sobre los electrodos modificados, correspondientes a la funcionalización 4-ABA

con y sin anticuerpos enlazados [Rahman, 2008; Rodríguez, 2008]. Las etapas implicadas en la fabricación del inmunosensor se resumen en el Esquema 4.4.



Esquema 4.4. Detalles de la química superficial implicada en la inmovilización covalente de anticuerpos mediante la funcionalización de la superficie electródica con 4-ABA y la posterior activación de los grupos carboxílicos empleando el método de los ésteres activos.

Optimización de las condiciones de medida

Con objeto de obtener la mejor señal amperométrica se evaluó la influencia del potencial aplicado al electrodo de trabajo y del pH de la disolución reguladora de fosfato 0.1 M empleada como medio de medida para la obtención de estas señales electroquímicas. Se compararon las respuestas obtenidas con inmunosensores preparados inmovilizando antiSPY como se ha descrito anteriormente, e incubados posteriormente con disoluciones del trazador enzimático SPY-HRP en ausencia de antibiótico libre. Se evaluó la influencia del potencial aplicado en el intervalo comprendido entre -50 y -250 mV (frente al electrodo de pseudo-referencia de Ag). Como se observa en la **Figura 4.34a**, la intensidad de corriente medida aumentaba considerablemente desde -50 V hasta -200 mV, manteniéndose constante para potenciales más negativos, por lo que se seleccionó un potencial de -200 mV para estudios posteriores. La influencia del pH del medio de medida (estudiada entre 5.5 y 7.5) demostró que las mejores señales amperométricas se obtenían trabajando en disolución reguladora de fosfato de pH 6.0 (**Figura 4.34b**). Ambos valores seleccionados estuvieron en concordancia con los elegidos para realizar las medidas amperométricas con los magnetosensores desarrollados y comentados en el *Apartado 4.1*.

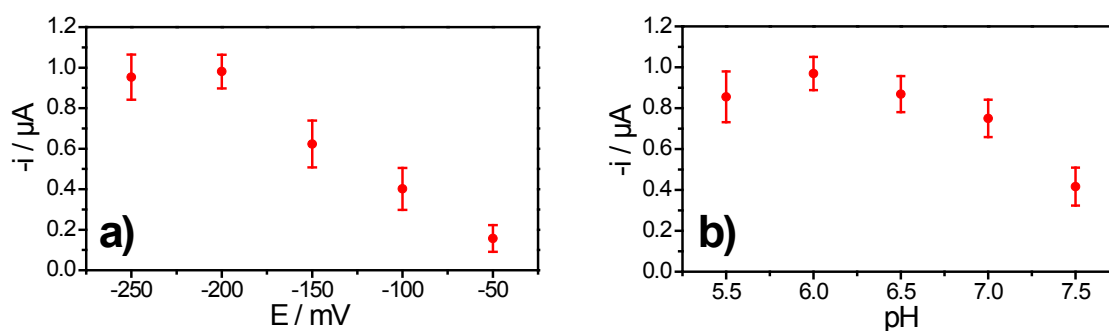


Figura 4.34. Dependencia de las señales amperométricas obtenidas para el inmunosensor de SPY en ausencia de antibiótico con: **a)** potencial aplicado al SPdCE y **b)** pH de la disolución reguladora de fosfato 0.1 M. Condiciones experimentales: **a)** medio de medida a pH 7.0; **b)** $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$).

Evaluación de adsorciones inespecíficas

Con el fin de evaluar la presencia de adsorciones inespecíficas del trazador enzimático sobre la superficie del electrodo modificado se compararon las respuestas amperométricas obtenidas tras la incubación con disoluciones de SPY-HRP en PBST sobre electrodos funcionalizados con y sin anticuerpo inmovilizado en su superficie. Mientras que para los electrodos sin anticuerpo inmovilizado la respuesta electroquímica será la correspondiente a la corriente de fondo y la debida a la unión inespecífica del trazador enzimático en la superficie del electrodo de trabajo, para los electrodos con anticuerpo inmovilizado, la respuesta incluirá también la corriente debida al SPY-HRP capturado específicamente por el anticuerpo.

Tras comprobarse la presencia de adsorciones inespecíficas y con el fin de minimizarlas se ensayaron tres agentes bloqueantes diferentes: caseína, BSA y leche. Como se aprecia en la **Figura 4.35**, la mejor relación entre señales específicas e inespecíficas se obtuvo tras realizar una etapa de bloqueo con una disolución de caseína al 0.2 % (p/v, preparada en PBST) durante 10 min, por lo que se seleccionó este agente bloqueante para establecer las características analíticas del inmunosensor.

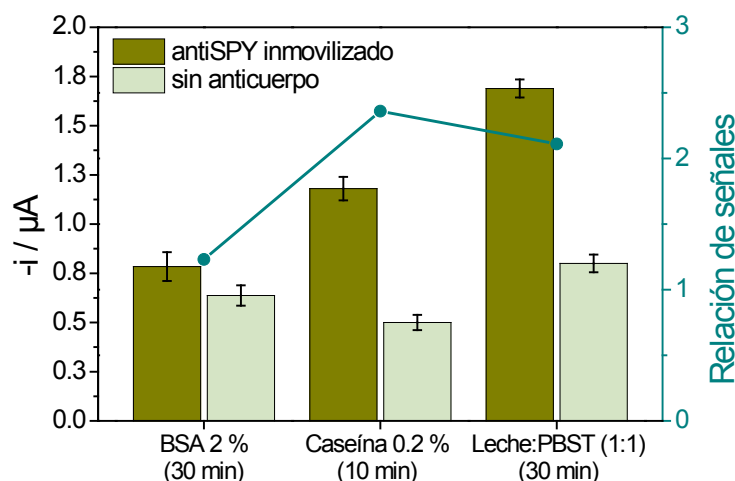


Figura 4.35. Evaluación de diferentes agentes bloqueantes: BSA 2 % (p/v), caseína 0.2 % (p/v) y leche UHT diluida con PBST (1:1). Señales amperométricas obtenidas en ausencia y en presencia de antiSPY inmovilizado, tras incubarlo en disoluciones de SPY-HRP $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. $E_{ap} = -200 \text{ mV}$ (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones entre las señales específicas y las debidas a adsorciones inespecíficas del antígeno.

Optimización de la cantidad de anticuerpo inmovilizado

Se optimizó la concentración de la disolución del anticuerpo antiSPY empleada para la modificación de las superficies electródicas, preparando diferentes inmunosensores, variando dicha concentración entre 12 y $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para la inmovilización del anticuerpo se depositó una alícuota de $5 \mu\text{L}$ de la disolución de antiSPY sobre los electrodos de trabajo previamente funcionalizados y activados y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min. Una vez transcurrido este tiempo, los electrodos se lavaron con PBST y se secaron bajo corriente de N_2 , procediendo a continuación al bloqueo de la superficie electródica y a su incubación en una disolución de SPY-HRP ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Los resultados obtenidos demostraron que la respuesta amperométrica aumentaba significativamente con la concentración de anticuerpo en todo el intervalo ensayado. Como solución de compromiso entre el gasto de inmunorreactivo y la señal

amperométrica obtenida se decidió utilizar una concentración de la disolución de anticuerpo de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ en experimentos posteriores.

Se estudió también el tiempo de incubación de los electrodos con la disolución de antiSPY, variando este tiempo entre 0 y 240 min. Se observó un aumento de intensidad en las señales amperométricas obtenidas hasta los 90 min, permaneciendo prácticamente constante hasta los 120 min y disminuyendo para tiempos superiores, por lo que se eligió un tiempo de 90 min como óptimo para esta etapa de incubación.

Optimización del trazador enzimático

La concentración de trazador enzimático se evaluó estudiando la relación entre las señales amperométricas obtenidas tras incubar electrodos con y sin anticuerpo inmovilizado, en disoluciones con distinta concentración de SPY-HRP. Empleando electrodos duales, durante la etapa de inmovilización del anticuerpo se depositó en uno de los electrodos de trabajo la disolución de antiSPY y en el otro una alícuota de PBST para la evaluación de las adsorciones inespecíficas. Una vez preparados los sensores y tras la correspondiente etapa de bloqueo, se depositó en la superficie del electrodo serigrafiado una alícuota de $50 \mu\text{L}$ de la disolución de trazador enzimático, cubriendo ambos electrodos de trabajo y se dejó incubar en atmósfera húmeda a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido este tiempo los electrodos se lavaron con PBST y se procedió a su medida electroquímica. Se ensayaron concentraciones de trazador enzimático comprendidas entre 1.0 y $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, obteniéndose la mayor relación entre señales específicas e inespecíficas para $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, por lo que se eligió esta concentración de SPY-HRP para experimentos posteriores. Debido al gasto considerable de inmunorreactivo y a la adecuada magnitud de las señales obtenidas, se decidió no ensayar concentraciones superiores de trazador enzimático. De la misma forma se estudió el tiempo de incubación con el trazador enzimático, variándolo entre 0 y 60 min. La mayor relación entre señales específicas e inespecíficas se obtuvo para 30 min, por lo que se eligió este tiempo para sucesivos experimentos.

4.2.1.3 Características analíticas del inmunosensor

Para evaluar las características analíticas del inmunosensor desarrollado se empleó la sulfapiridina como antibiótico modelo. Se construyó la correspondiente curva de calibrado con inmunosensores preparados de acuerdo a las condiciones optimizadas previamente. La etapa de competición se realizó incubando sobre la superficie de los electrodos duales una alícuota de $50 \mu\text{L}$ de una disolución de PBST conteniendo la concentración optimizada de SPY-HRP y concentraciones variables de SPY. La curva de calibrado construida a partir de las señales amperométricas obtenidas en función de la concentración de SPY se representa en la **Figura 4.36a**, así como un ejemplo de las señales amperométricas registradas (**Figura 4.36b**).

La curva de calibrado obtenida mostró el hábito esperado para un formato de ensayo competitivo directo, con un IC_{50} de $(6.1 \pm 0.4) \text{ ng mL}^{-1}$, un ID comprendido entre (0.59 ± 0.03) y $(64 \pm 4) \text{ ng mL}^{-1}$ y un LD de $(0.15 \pm 0.02) \text{ ng mL}^{-1}$. Es interesante destacar que el LD obtenido fue aproximadamente 600 veces inferior al LMR establecido por la legislación Europea para sulfonamidas en leche. Los resultados obtenidos demostraron por tanto las atractivas características del inmunosensor desarrollado para su aplicación al análisis de muestras de leche.

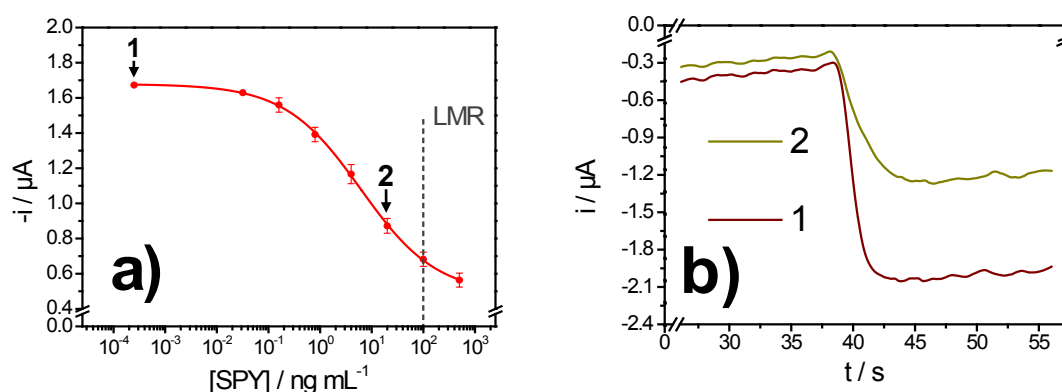


Figura 4.36. a) Curva de calibrado obtenida para SPY con el inmunosensor desarrollado en disolución reguladora PBST. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se indica el LMR establecido en leche por la legislación Europea. **b)** Respuestas amperométricas obtenidas a -200 mV (vs. Ag) para las concentraciones indicadas en a).

4.2.1.4 Características analíticas del inmunosensor en leche

Para demostrar la aplicabilidad del inmunosensor desarrollado en el análisis de leche, se llevó a cabo la comparación de las respuestas amperométricas obtenidas para sensores preparados en presencia y ausencia de anticuerpo, tras la incubación de una disolución de leche diluida 1:1 con PBST conteniendo SPY-HRP. De manera análoga a lo comentado en el *Apartado 4.1.3 (Figura 4.19)*, se observó que no fue necesaria ninguna etapa de bloqueo cuando se analizaron disoluciones de leche, siendo la señal inespecífica sólo el 30 % de la señal específica, en comparación con el 50 % obtenido al bloquear la superficie electródica con leche:PBST (1:1) y el 45 % al bloquear con caseína (**Figura 4.35**). Estos resultados, observados y descritos previamente por otros autores pueden atribuirse a que los componentes intrínsecos de la matriz de la leche (proteínas, azúcares y grasas) minimizan las uniones inespecíficas del trazador enzimático a la superficie electródica durante la etapa de incubación [Setford, 1999].

Con objeto de obtener las mejores características analíticas para la aplicación del inmunosensor desarrollado en el análisis de sulfonamidas en muestras de leche, se compararon las curvas de calibrado obtenidas para SPY en disoluciones de leche diluida con PBST (1:1) en presencia de diferentes concentraciones de SPY-HRP. Las curvas de calibrado se muestran en la **Figura 4.37** y las características analíticas derivadas de las mismas se resumen en la **Tabla 4.7**.

En los tres casos se obtuvieron buenas características analíticas, destacando los bajos límites de detección obtenidos trabajando con una matriz compleja como es la leche. Debido a que el intervalo dinámico más amplio se obtuvo con $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de SPY-HRP, se seleccionó esta concentración para experimentos posteriores.

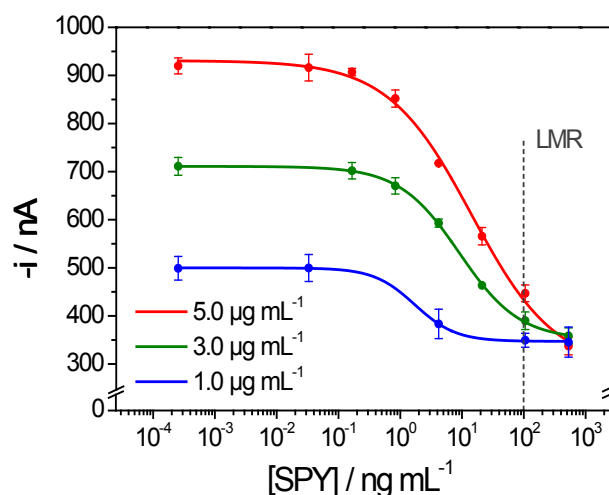


Figura 4.37. Curvas de calibrado obtenidas para SPY en disoluciones de leche:PBST (1:1), conteniendo tres concentraciones diferentes de trazador enzimático: 1.0, 3.0 y 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se indica el LMR establecido en leche por la legislación Europea.

Tabla 4.7. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas para SPY con el inmunosensor desarrollado en disoluciones de leche:PBST (1:1) conteniendo diferentes concentraciones de SPY-HRP.

[SPY-HRP] / $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.0	3.0	5.0
r^2	0.999	0.999	0.996
IC_{50} / ng mL^{-1}	1.6 ± 0.1	8.6 ± 0.6	14 ± 1
ID / ng mL^{-1}	0.54 ± 0.04 a 4.6 ± 0.3	1.8 ± 0.1 a 41 ± 3	1.6 ± 0.1 a 118 ± 9
LD / ng mL^{-1}	0.29 ± 0.02	0.54 ± 0.04	0.44 ± 0.04

Se evaluó la posible existencia de efecto matriz en las muestras analizadas comparando los parámetros analíticos obtenidos para diferentes muestras de leche. Se analizaron cuatro tipos diferentes de leche UHT: entera, semidesnatada y desnatada, así como una leche pasteurizada entera, construyendo curvas de calibrado para SPY en cada una de estas matrices diluidas 1:1 con PBST. Como se observa en la **Figura 4.38**, se obtuvieron curvas de hábito similar para todos los tipos de leche analizada y distintas a la obtenida en PBST. Estos resultados indicaron la posibilidad de usar una matriz de leche representativa como referencia para construir una curva de calibrado donde interpolar la señal medida para la determinación de residuos de SPY en cada tipo de leche. Las características analíticas derivadas de estas curvas de calibrado se resumen en la **Tabla 4.8**, observándose un comportamiento muy atractivo del biosensor desarrollado en todos los tipos de leche ensayados, permitiendo alcanzar límites de detección inferiores a 1 ng mL^{-1} lo que demuestra la capacidad del inmunosensor desarrollado para asegurar el cumplimiento con la legislación Europea en este tipo de muestras.

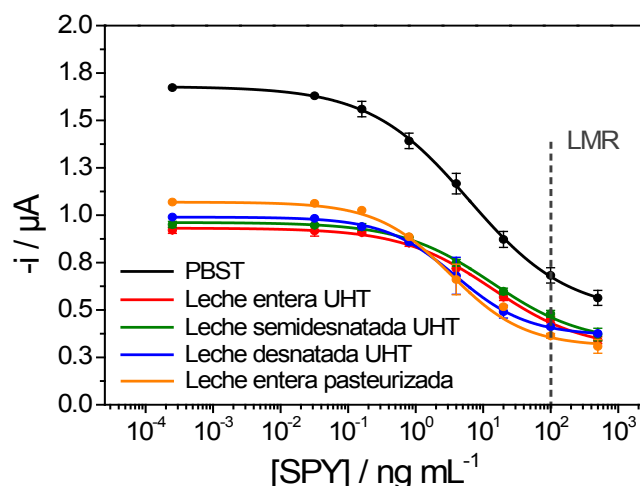


Figura 4.38. Curvas de calibrado construidas para SPY con el inmunosensor desarrollado en diferentes tipos de leche diluidas 1:1 con PBST. A modo de comparación se muestra también la curva de calibrado obtenida para SPY en PBST (bloqueando previamente la superficie electródica con caseína). $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se indica el LMR establecido en leche por la legislación Europea.

Tabla 4.8. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas para SPY con el inmunosensor desarrollado, en diferentes disoluciones de leche diluida 1:1 con PBST.

Tipo de leche	Entera pasteurizada	UHT		
		Entera	Semidesnatada	Desnatada
r^2	0.997	0.996	0.996	0.999
$IC_{50} / ng mL^{-1}$	3.3 ± 0.2	14 ± 1	13.6 ± 0.4	4.0 ± 0.3
$ID / ng mL^{-1}$	0.57 ± 0.04 $a 19 \pm 1$	1.6 ± 0.1 $a 118 \pm 9$	1.57 ± 0.05 $a 118 \pm 4$	0.73 ± 0.05 $a 22 \pm 2$
$LD / ng mL^{-1}$	0.21 ± 0.01	0.44 ± 0.04	0.44 ± 0.01	0.27 ± 0.02

Se evaluó también el efecto de la dilución de la muestra sobre las características analíticas construyendo curvas de calibrado tras aplicar diferentes factores de dilución a leche entera UHT (**Figura 4.39**). Las características analíticas resultantes se resumen en la **Tabla 4.9**.

Como puede observarse en la **Figura 4.39**, a medida que aumenta el factor de dilución la curva de calibrado se desplaza a valores superiores en el eje de ordenadas, aproximándose a la curva obtenida para PBST. Como se ha mencionado anteriormente, este efecto puede atribuirse a la minimización de las adsorciones inespecíficas del trazador enzimático debido al efecto bloqueante de alguno de los componentes de la matriz de la leche.

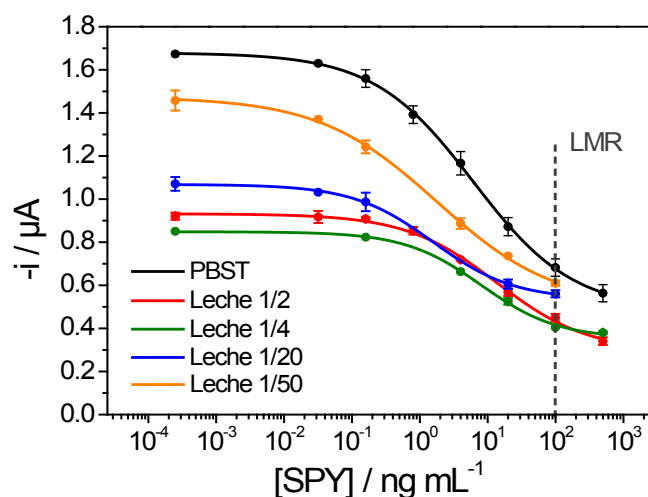


Figura 4.39. Curvas de calibrado construidas para SPY con el inmunosensor desarrollado en leche entera UHT después de aplicar diferentes diluciones con PBST. A modo de comparación se muestra también la curva de calibrado obtenida para SPY en PBST (bloqueando previamente la superficie electródica con caseína). $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se indica el LMR establecido en leche por la legislación Europea.

Tabla 4.9. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas para SPY con el inmunosensor desarrollado, en disoluciones de leche entera UHT preparadas por diferente dilución con PBST.

Dilución	1/50	1/20	1/4	1/2	sin diluir
r^2	0.998	0.999	0.997	0.996	0.998
$IC_{50} / ng mL^{-1}$	1.8 ± 0.1	1.6 ± 0.1	8.0 ± 0.6	14 ± 1	5.4 ± 0.6
$ID / ng mL^{-1}$	0.112 ± 0.007 a 29 ± 2	0.23 ± 0.02 a 10.4 ± 0.7	1.3 ± 0.1 a 49 ± 4	1.6 ± 0.1 a 118 ± 9	0.70 ± 0.07 a 44 ± 4
$LD / ng mL^{-1}$	0.022 ± 0.002	0.077 ± 0.005	0.46 ± 0.03	0.44 ± 0.04	0.20 ± 0.02

Se evaluó la reproducibilidad de las respuestas amperométricas obtenidas con diferentes inmunosensores preparados el mismo día o en días diferentes en disoluciones de leche entera UHT diluida con PBST (1:1) en ausencia de antibióticos, conteniendo la cantidad optimizada de trazador enzimático. Las respuestas amperométricas obtenidas para seis inmunosensores diferentes preparados el mismo día proporcionaron una RSD del 3.2 %. Para cuatro inmunosensores preparados en días diferentes se obtuvo un valor de RSD del 5.3 %. Estos resultados demostraron que el proceso de fabricación de los inmunosensores es fiable y que se pueden obtener respuestas amperométricas reproducibles con diferentes inmunosensores preparados de la misma manera.

Se evaluó la respuesta del inmunosensor amperométrico desarrollado frente a diferentes sulfonamidas empleadas comúnmente en medicina veterinaria. Este estudio se realizó preparando curvas de calibrado para todos los antibióticos ensayados en leche entera UHT diluida con PBST (1:1). Las curvas de calibrado obtenidas, así como las características analíticas asociadas a las mismas se presentan en la **Figura 4.40** y **Tabla 4.10**, respectivamente.

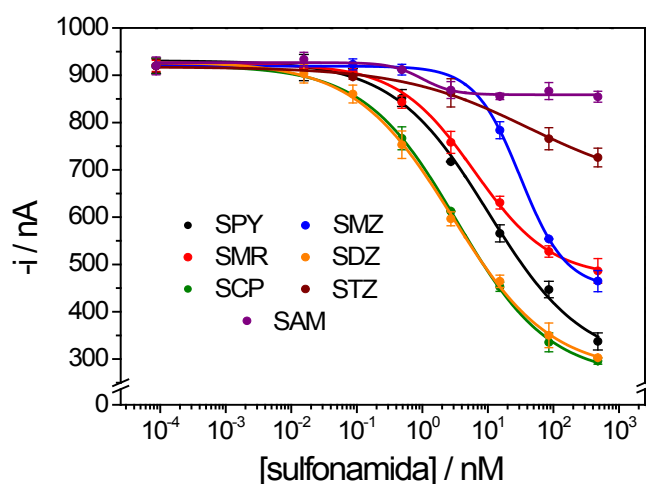


Figura 4.40. Curvas de calibrado obtenidas con el inmunosensor desarrollado para diferentes sulfonamidas (SPY, SMR, STZ, SMZ, SDZ, SCP y SAM) en leche entera UHT diluida 1:1 con PBST. $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$).

Tabla 4.10. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas para diferentes sulfonamidas con el inmunosensor desarrollado en disoluciones de leche UHT diluida con PBST (1:1).

Sulfonamida	SPY	SMR	STZ	SMZ	SDZ	SCP
r^2	0.996	0.999	0.998	0.999	0.999	0.999
$IC_{50} / ng\ mL^{-1}$	14 ± 1	9.6 ± 0.5	15.3 ± 0.9	43 ± 2	4.2 ± 0.1	5.6 ± 0.3
$ID / ng\ mL^{-1}$	1.6 ± 0.1 $a\ 118 \pm 9$	1.32 ± 0.07 $a\ 69 \pm 4$	2.7 ± 0.2 $a\ 88 \pm 5$	15.4 ± 0.8 $a\ 124 \pm 7$	0.45 ± 0.01 $a\ 39 \pm 2$	0.68 ± 0.04 $a\ 45 \pm 2$
$LD / ng\ mL^{-1}$	0.44 ± 0.04	0.42 ± 0.02	0.96 ± 0.06	8.4 ± 0.4	0.123 ± 0.004	0.20 ± 0.01
% RC	100	151	91	35	326	280

Como se observa, la mayoría de las sulfonamidas ensayadas (SPY, SMR, SMZ, SDZ y SCP) fueron adecuadamente reconocidas por el inmunosensor, alcanzándose límites de detección comprendidos entre 0.123 y $8.4\ ng\ mL^{-1}$, concentraciones considerablemente inferiores al LMR establecido por la legislación. No se observó competición significativa para SAM, sulfonamida empleada principalmente en el tratamiento de infecciones oculares [Sensoy, 2009].

Se estudió la estabilidad del inmunosensor amperométrico preparando el mismo día diferentes inmunosensores y almacenándolos a $4\ ^\circ C$ o a temperatura ambiente. Se construyó el gráfico de control correspondiente a ambas temperaturas. Para ello se realizaron medidas amperométricas con cinco inmunosensores distintos el día de su preparación y con dos inmunosensores diferentes cada día de control, en disoluciones de leche entera UHT diluida con PBST (1:1), conteniendo la concentración optimizada de SPY-HRP y en ausencia de antibiótico libre. Con los datos obtenidos se construyó el gráfico de control mostrado en la **Figura 4.41**, cuyo valor central fue el valor medio de las cinco medidas amperométricas realizadas el primer día del estudio y se tomaron como límites de control superior e inferior el triple de la desviación estándar de estas cinco medidas.

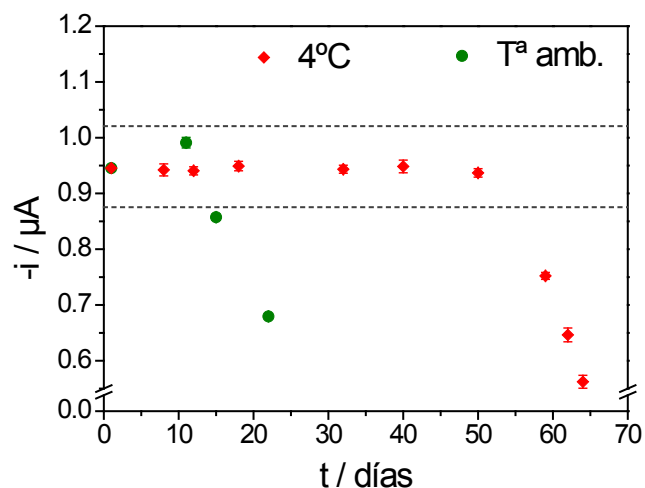


Figura 4.41. Gráfico de control construido para el estudio de la estabilidad del inmunosensor desarrollado, almacenando los sensores preparados a 4 °C o a temperatura ambiente. Las señales corresponden a las medidas amperométricas realizadas a -200 mV (vs. Ag), tras la incubación de estos inmunosensores en disoluciones de leche:PBST (1:1) conteniendo SPY-HRP y en ausencia de sulfonamidas libres.

Como puede observarse, las respuestas amperométricas permanecieron dentro de los límites del gráfico de control durante aproximadamente 10 días para los inmunosensores almacenados a temperatura ambiente y hasta 50 días para los almacenados a 4 °C. Estos resultados demostraron la elevada estabilidad de los inmunosensores desechables desarrollados, que pueden ser preparados y almacenados hasta su utilización.

4.2.1.5 Selectividad del inmunosensor desarrollado

Se evaluó la selectividad del inmunosensor amperométrico desarrollado frente a antimicrobianos pertenecientes a otras familias de antibióticos potencialmente interferentes por encontrarse habitualmente en muestras de leche y productos lácteos. Este estudio se realizó evaluando las mismas concentraciones seleccionadas para construir la curva de calibrado de SPY con PENG, ENRO, TC y CEF, como sustancias representativas de las distintas familias de antibióticos. Como se observa en la **Figura 4.42** no se obtuvo reactividad cruzada apreciable con estos antibióticos potencialmente interferentes, lo que demostró la marcada selectividad del anticuerpo empleado frente a la familia de las sulfonamidas.

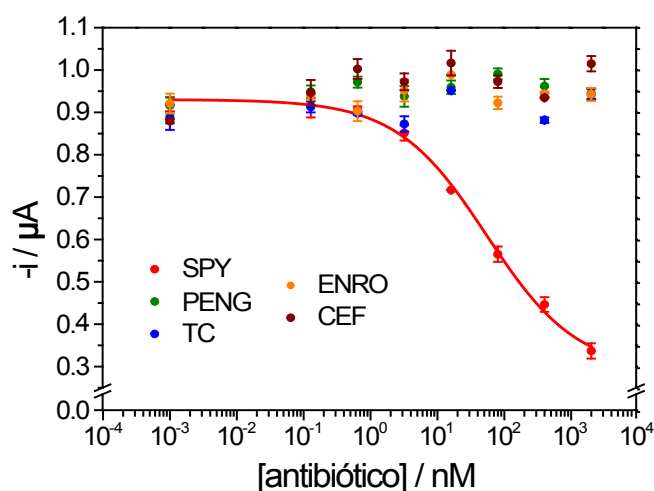


Figura 4.42. Evaluación de las respuestas amperométricas obtenidas con el inmunosensor desarrollado frente a disoluciones de diferente concentración de los antibióticos PENG, ENRO, TC y CEF preparadas en leche entera UHT diluida 1:1 con PBST. A modo de comparación se muestra también la curva de calibrado obtenida para SPY en el mismo medio. $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$).

4.2.1.6 Determinación de sulfonamidas en leche

La utilidad del inmunosensor amperométrico en el análisis de muestras reales se evaluó mediante el análisis de leche entera UHT diluida con PBST (1:1) y contaminada con SPY a una concentración de 8.7 ng mL^{-1} . Teniendo en cuenta el efecto matriz comentado anteriormente, la determinación de SPY se realizó por interpolación de los valores de intensidad de corriente medidos en las muestras en la curva de calibrado construida para el antibiótico en la misma matriz. En el análisis de diez muestras de leche se obtuvo un valor medio de $(8.9 \pm 0.3) \text{ ng mL}^{-1}$ y una recuperación media de $(103 \pm 3) \%$, para una probabilidad del 95 %. Estos resultados demostraron la utilidad del inmunosensor amperométrico desechable para la determinación de bajas concentraciones de sulfonamidas (aproximadamente once veces inferiores a los LMRs establecidos) en muestras de leche, en un tiempo de aproximadamente 30 min (una vez preparados los inmunosensores).

Se realizaron también estudios de recuperación en disoluciones de leche contaminadas con SPY 35 nM (8.7 ng mL^{-1}) y dos antimicrobianos representativos de otras familias de antibióticos (PENG y TC) al mismo nivel de concentración y a una concentración diez veces superior. Para tres muestras contaminadas con SPY:PENG:TC (1:1:1) y (1:10:10) se obtuvieron recuperaciones medias en la determinación de SPY de $(105 \pm 8) \%$ y $(105 \pm 6) \%$, respectivamente. Estos resultados confirmaron la selectividad de la metodología empleada en la detección de sulfonamidas, incluso en presencia de un exceso elevado de otros antibióticos potencialmente interferentes.

Se verificó también la capacidad del inmunosensor para la detección del contenido total de sulfonamidas en muestras que contienen una mezcla de las mismas. Las respuestas amperométricas obtenidas para muestras de leche contaminadas con SPY a tres concentraciones diferentes se compararon con aquellas obtenidas para muestras contaminadas con una mezcla de seis sulfonamidas diferentes (en la misma proporción de concentraciones individuales) a la misma concentración total (60, 120 y 240 nM). La **Figura 4.43** muestra como sólo se observaron pequeñas diferencias entre los valores de corriente medidos para ambos tipos de muestras y

que son debidas a la diferente sensibilidad que presenta el inmunosensor para las distintas sulfonamidas. Sin embargo, estos resultados confirman claramente la utilidad del inmunosensor para la determinación del contenido total de residuos de sulfonamidas en muestras de leche.

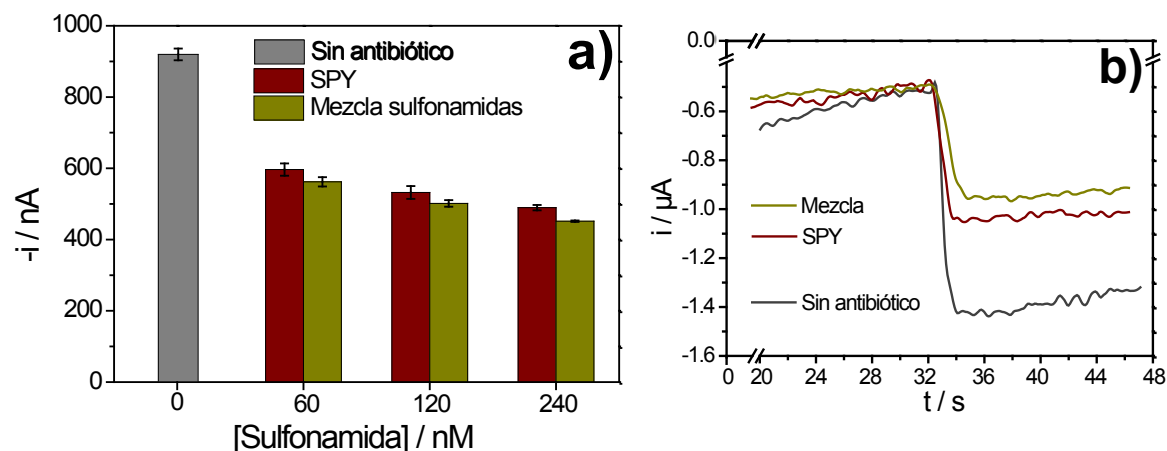


Figura 4.43. a) Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas con el inmunosensor desarrollado para disoluciones de leche entera UHT, diluida 1:1 con PBST y contaminadas con diferentes concentraciones de SPY o con una mezcla de seis sulfonamidas (SPY, SMR, STZ, SMZ, SDZ y SCP) a la misma concentración total. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). **b)** Señales amperométricas registradas a -200 mV (vs. Ag) para disoluciones de leche sin contaminar y contaminadas con SPY o la mezcla de las seis sulfonamidas a una concentración total de 120 nM.

4.2.1.7 Detección rápida de sulfonamidas

Se estudió la posibilidad de reducir el tiempo del ensayo necesario para la detección de sulfonamidas comparando las respuestas amperométricas obtenidas tras incubar el inmunosensor desarrollado durante diferentes tiempos en disoluciones de leche entera UHT diluida (1:1) con PBST, conteniendo diferentes concentraciones de SPY y la concentración establecida de trazador enzimático. Como se observa en la **Figura 4.44**, aunque, como era de esperar, la magnitud de las señales amperométricas registradas fue menor al disminuir el tiempo de incubación, dichas señales fueron, en todos los casos, suficientes para poder detectar con fiabilidad la presencia de residuos de sulfonamidas por encima de un determinado nivel. Así, fue posible discriminar claramente entre muestras de leche libres de antibiótico o conteniendo 50 $ng\ mL^{-1}$ de SPY en un tiempo de análisis de tan sólo 2.5 min, por lo que el procedimiento propuesto puede constituir un método rápido de alarma para clasificar las muestras de leche de acuerdo a su cumplimiento con la legislación vigente.

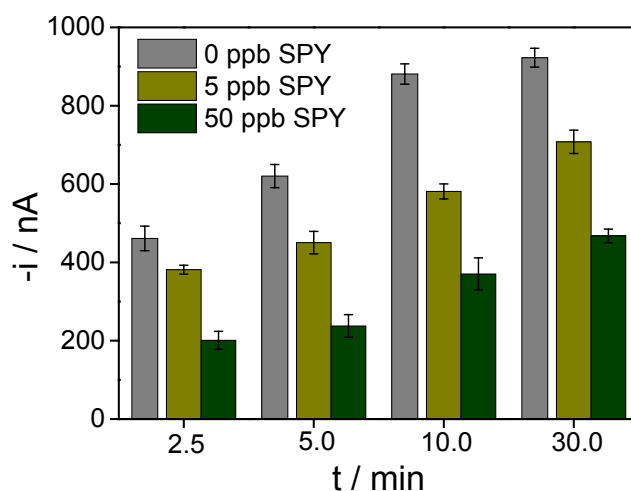


Figura 4.44. Señales amperométricas obtenidas para distintos tiempos de incubación del inmunosensor en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con PBST conteniendo diferentes concentraciones de SPY y una concentración establecida de trazador enzimático. $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$).

4.2.1.8 Conclusiones

Se ha desarrollado un inmunosensor amperométrico desechable para la determinación de residuos de sulfonamidas que permite la determinación selectiva de esta familia de antibióticos en leche, gracias a la elevada especificidad de los inmunorreactivos empleados en su preparación. Este inmunosensor ha permitido cuantificar bajos niveles de residuos de sulfonamidas, muy inferiores a los LMRs establecidos por la legislación Europea vigente para las especies analizadas y en las diferentes matrices ensayadas. Los estudios de reproducibilidad efectuados demostraron además que la determinación realizada presenta una elevada fiabilidad y reproducibilidad, todo ello sin requerir tratamientos de muestra complejos.

Se demostró también la capacidad del inmunosensor desarrollado para la detección de mezclas de antibióticos pertenecientes a la familia de las sulfonamidas, siendo por tanto de utilidad para confirmar el cumplimiento con la legislación vigente, que establece los límites máximos para el total de residuos de todas aquellas especies pertenecientes al grupo de las sulfonamidas.

También se ha demostrado la posibilidad de emplearlo como sistema de alarma rápido (2.5 min) para verificar si una muestra de leche contiene o no residuos de sulfonamidas por encima del LMR establecido por la legislación.

Las atractivas características analíticas que presenta el biosensor desarrollado, junto con el uso de electrodos serigrafiados producidos en masa, hacen del inmunosensor desechable propuesto una interesante plataforma de análisis que se presenta como una alternativa fiable, útil y asequible frente a los métodos descritos hasta el momento para la determinación de residuos de sulfonamidas en leche.

4.2.2 Determinación de antibióticos β -lactámicos

En este trabajo se empleó una novedosa estrategia para la inmovilización sobre superficies de carbono de la PBP utilizada como elemento de reconocimiento en el magnetosensor de afinidad descrito anteriormente (*Apartado 4.1.3*), para el desarrollo de un biosensor integrado de afinidad para la determinación de antibióticos β -lactámicos. Como se observa en la **Figura 4.45**, se modificaron SPdCEs con grupos de ácido nitrilotriacético (NTA), complejados a iones Co^{2+} , que permitieron la inmovilización de la PBP recombinante a través de su *tag* de histidinas.

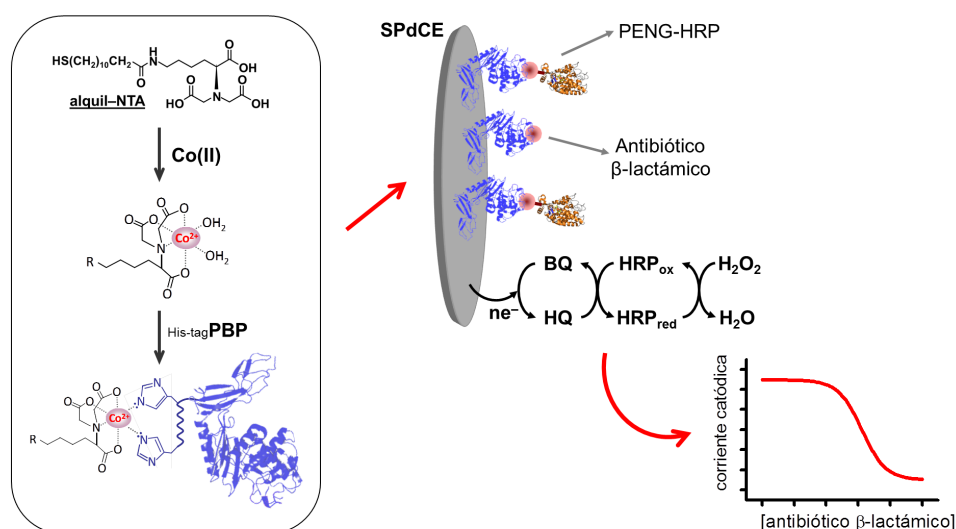


Figura 4.45. Representación esquemática de las etapas implicadas en el desarrollo del biosensor de afinidad para la determinación de residuos de antibióticos β -lactámicos. La proteína recombinante se inmoviliza sobre la superficie modificada del SPdCE con NTA- Co^{2+} a través de su *tag* de histidinas. Los antibióticos β -lactámicos en la muestra compiten con una cantidad fija de PENG-HRP por los sitios de unión de la proteína inmovilizada. La adición del sustrato enzimático H_2O_2 en presencia del mediador redox HQ permite la obtención de la señal amperométrica correspondiente.

La determinación de residuos de antibióticos β -lactámicos en leche se realizó estableciendo un ensayo competitivo directo entre los antibióticos libres en la muestra y una concentración fija del trazador enzimático PENG-HRP, realizando medidas amperométricas con el sistema HQ- H_2O_2 .

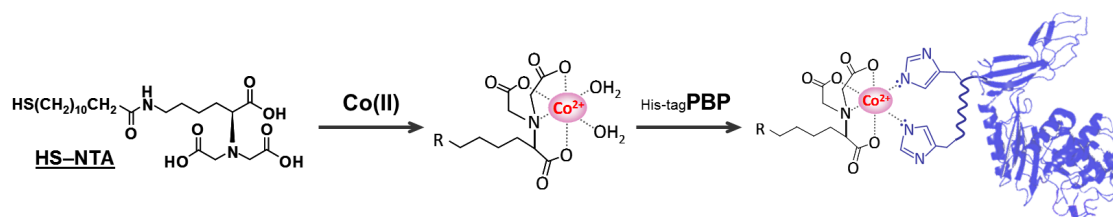
4.2.2.1 Inmovilización de la PBP recombinante

En primer lugar se evaluó la posibilidad de inmovilizar covalentemente la proteína recombinante, tanto sobre superficies de carbono como mediante su anclaje a monocapas autoensambladas de mercaptoácidos sobre superficies de oro. Sin embargo, con estos protocolos de inmovilización no se obtuvieron diferencias significativas entre las señales amperométricas registradas al incubar sensores preparados con y sin PBP en disoluciones de PENG-HRP. Estos resultados se atribuyeron a una inmovilización no orientada de la proteína

recombinante que posiblemente bloquea el sitio de unión a los antibióticos β -lactámicos impidiendo el reconocimiento de los mismos.

Inmovilización orientada de la proteína recombinante

Aprovechando el *tag* de histidinas con el que se clonó, se estudió la posible inmovilización orientada de la PBP. Así, empleando el compuesto comercial *N*-[*N*_α,*N*_α-bis(carboximetil)-L-lisina]-12-mercaptododecanamida (HS-NTA) se generaron monocapas auto-ensambladas de este derivado del ácido nitrilotriacético sobre electrodos de oro que, tras su complejación con un metal bivalente (p. ej. Co^{2+}), permitieron la inmovilización de la proteína mediante interacción con las moléculas de histidina de dicho *tag* formando un complejo de coordinación, como se muestra en el **Esquema 4.5**.



Esquema 4.5. Inmovilización de la PBP recombinante a través de su *tag* de histidinas, mediante la formación de un complejo de coordinación con el NTA- Co^{2+} . El grupo tiol del derivado de NTA permitió su autoensamblaje sobre superficies de oro.

Se estudió también la posibilidad de realizar una inmovilización análoga sobre electrodos de carbono. Varios autores han descrito fuertes adsorciones de compuestos que disponen de cadenas alquílicas largas sobre superficies de carbono [Hentschke, 1992; Martin, 1999; Bickerstaffe, 2006; Yang, 2008] y diversos estudios termodinámicos sugieren que la adsorción de estas moléculas se produce con el eje longitudinal de la cadena alquílica dispuesta sobre la superficie de carbono [Bhinde, 2010]. Considerando estos precedentes, se decidió estudiar la posible inmovilización de la molécula HS-NTA sobre la superficie de electrodos serigrafiados de carbono.

Estudios de desorción en medio alcalino (ver *Apartado 3.4.12*) corroboraron la fuerte adsorción del derivado alquílico del ácido nitrilotriacético sobre la superficie de carbono. Como se observa en la **Figura 4.46**, el barrido voltamperométrico realizado para la desorción electroquímica en medio alcalino de un electrodo incubado con HS-NTA mostró un pico intenso, en comparación con los obtenidos para electrodos sin modificar, en ausencia o en presencia del compuesto en disolución, lo que confirmó su fuerte adsorción sobre la superficie electródica.

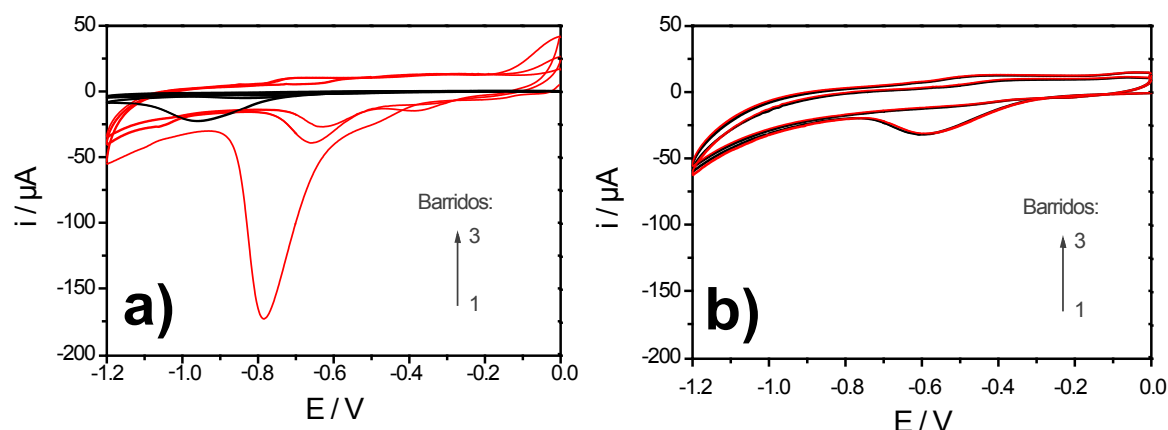


Figura 4.46. Barridos sucesivos de desorción electroquímica obtenidos en medio alcalino con electrodos serigrafiados duales de carbono. **a)** WE₁ (—): HS-NTA inmovilizado en su superficie; WE₂ (—): electrodo sin modificar. **b)** WE₁ y WE₂ (ambos sin modificar) HS-NTA 10 mM en disolución. Medio NaOH 0.1 M, barrido de 0.0 a -1.2 V (vs. Ag), $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Con el fin de desarrollar el biosensor más sensible, se compararon las señales amperométricas registradas tras la inmovilización de la PBP sobre Co^{2+} coordinado a monocapas autoensambladas de HS-NTA sobre electrodos serigrafiados de oro (curados a alta y baja temperatura) y capas densas de HS-NTA adsorbidas sobre electrodos de carbono. Como se observa en la **Figura 4.47** las mayores respuestas amperométricas se obtuvieron empleando los electrodos serigrafiados de carbono, por lo que se decidió continuar trabajando con estos sustratos para experimentos posteriores.

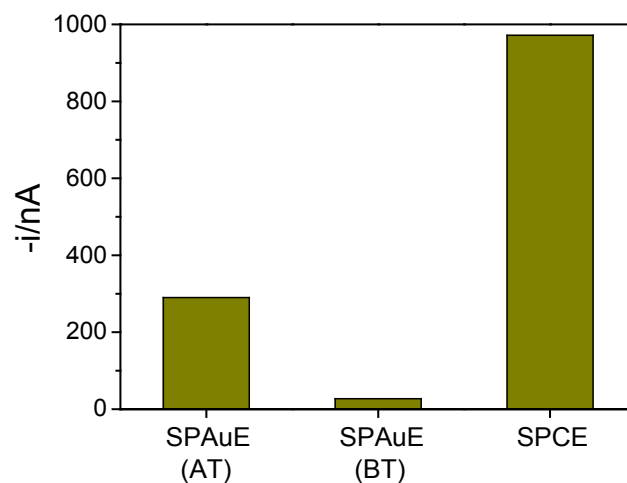


Figura 4.47. Comparación de las señales amperométricas obtenidas a -200 mV (vs. Ag) tras la incubación en disoluciones de leche entera UHT:PBST (1:1) conteniendo PENG-HRP para biosensores preparados por inmovilización de la PBP sobre Co^{2+} coordinado a monocapas de HS-NTA autoensambladas sobre electrodos serigrafiados de oro curados a alta temperatura (AT) y baja temperatura (BT) o a capas densas de HS-NTA adsorbidas sobre electrodos serigrafiados de carbono.

La posible intervención del grupo tiol del derivado comercial HS-NTA en la funcionalización de los electrodos serigrafiados de carbono se descartó al comparar mediante EIS el comportamiento de biosensores preparados tras la inmovilización de la PBP sobre sustratos modificados con la molécula análoga LAU-NTA sintetizada sin el grupo tiol (ver **Figura 4.48**).

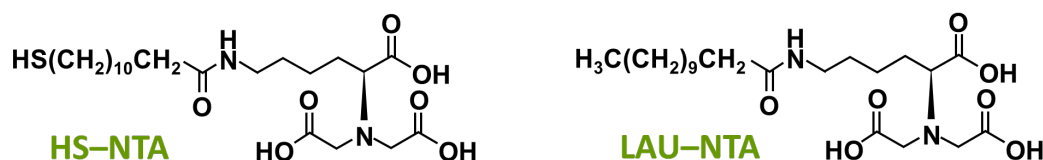


Figura 4.48. Estructuras de los derivados *N*-[*N* α ,*N* α -bis(carboximetil)-L-lisina]-12-mercaptododecanamida (HS-NTA) y *N*²,*N*²-bis(carboximetil)-*N*⁶-dodecanoil lisina (LAU-NTA).

En la **Figura 4.49** se muestran los diagramas de Nyquist correspondientes. A partir de los valores de resistencia a la transferencia de carga medidos sobre electrodos sin modificar y tras la adsorción de los derivados alquílicos de NTA se estimaron los porcentajes de recubrimiento (ver *Apartado 3.5.2*), resultando valores de $(74 \pm 3) \%$ y $(70 \pm 7) \%$ para HS-NTA y LAU-NTA, respectivamente. Estos resultados confirmaron la ausencia de diferencias significativas en el recubrimiento del electrodo con ambos derivados de NTA, demostrando la eficiente adsorción de ambos compuestos sobre la superficie de los SPdCEs y descartándose por tanto algún papel significativo del grupo tiol en el proceso de adsorción del HS-NTA sobre las superficies de carbono.

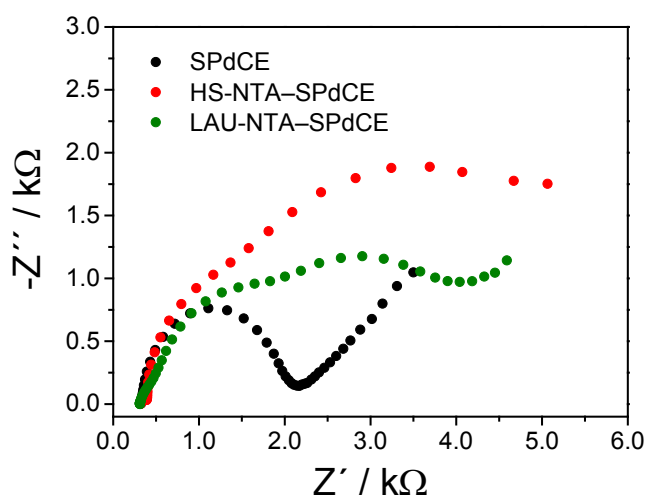


Figura 4.49. Diagramas de Nyquist ($-Z''$ vs. Z') obtenidos sobre SPdCEs sin modificar y modificados con HS-NTA y LAU-NTA. Medio: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mM cada uno) en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0); intervalo de frecuencias de 0.01 Hz a 10 kHz, $V_{\text{rms}} = 10$ mV.

Además, como se observa en la **Figura 4.50**, se obtuvieron respuestas amperométricas relativamente similares para los biosensores construidos usando tanto HS-NTA como LAU-NTA en la modificación de la superficie electródica de los SPdCEs.

De acuerdo con el esquema propuesto (ver **Esquema 4.5**), la inmovilización de la PBP recombinante se realizó a través de la interacción entre su *tag* de histidinas y los grupos NTA-Co^{2+} con los que se ha modificado la superficie de los electrodos serigraviados. La correcta modificación de la superficie electródica con los grupos NTA-Co^{2+} y la posterior inmovilización de la PBP se confirmó monitorizando cada una de las etapas de fabricación del biosensor mediante voltamperometría cíclica y EIS. Cabe destacar que para este y trabajos posteriores se emplearon las disoluciones reguladoras B&W y P&D para la inmovilización de la PBP y la etapa

de competición con PENG-HRP, respectivamente, debido a lo recomendado para este tipo de ensayos en sistemas análogos basados en el enlace de proteínas modificadas con un *tag* de histidinas, como se ha descrito en el *Apartado 4.1.3*.

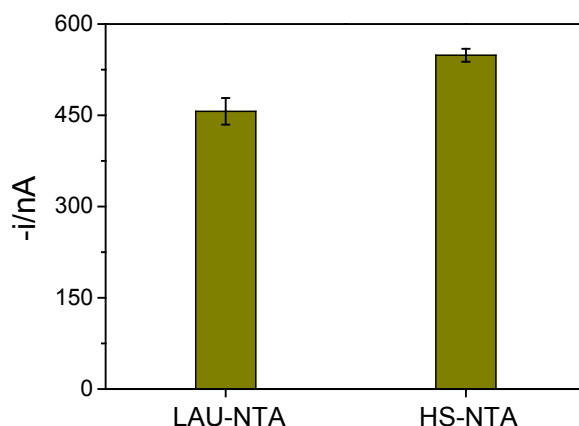


Figura 4.50. Señales amperométricas medidas a -200 mV (vs. Ag) para SPdCEs modificados con LAU-NTA o HS-NTA, Co^{2+} y PBP, tras su incubación en disoluciones de leche:P&D (1:1) conteniendo PENG-HRP. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=5$).

La **Figura 4.51a** muestra los barridos voltamperométricos registrados para el par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sobre un electrodo sin modificar y después de las diferentes modificaciones con HS-NTA, Co^{2+} y la Histag-PBP. En la **Figura 4.51b** se muestran los correspondientes diagramas de Nyquist.

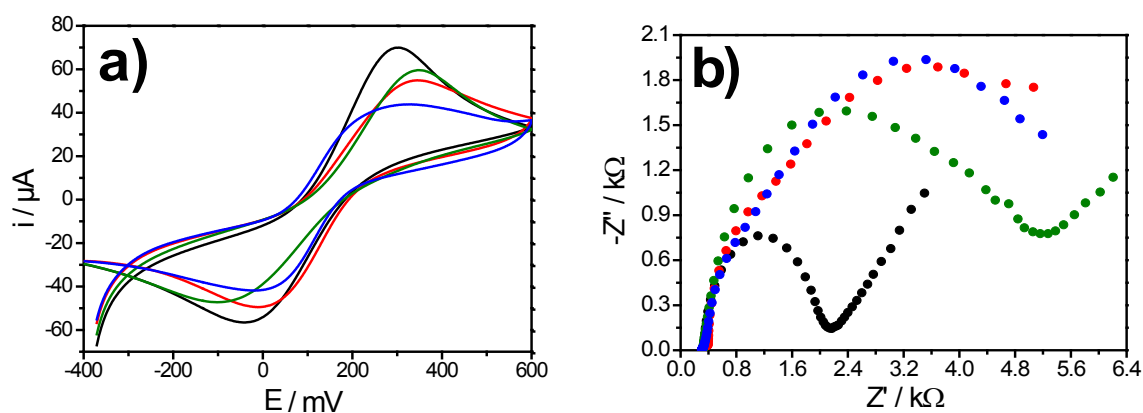


Figura 4.51. a) Voltamperogramas cíclicos y b) diagramas de Nyquist, obtenidos para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mM cada uno) en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0) sobre un SPdCE: sin modificar (—, ●); tras su funcionalización con HS-NTA (—, ●); después de la activación de los grupos NTA con Co^{2+} (—, ●); y tras la inmovilización de la PBP (—, ●). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; parámetros EIS: intervalo de frecuencias de 0.01 Hz a 10 kHz, $V_{\text{rms}} = 10 \text{ mV}$.

Como puede observarse, se produjo una disminución significativa de la respuesta voltamperométrica cuasirreversible para el SPdCE tras su modificación con HS-NTA, debido a la repulsión electrostática entre el par redox y los grupos $-\text{COO}^-$ a pH neutro. Sin embargo, cuando los grupos carboxilato del ligando se complejaban con el ion metálico, se observó un ligero incremento en la corriente de pico, lo que puede atribuirse al apantallamiento parcial de la superficie cargada negativamente por complejación con los iones Co^{2+} . La inmovilización de la PBP causó una barrera adicional para el acceso de la sonda redox a la superficie electródica, dando lugar a una disminución de la señal voltamperométrica, lo que demostró la habilidad de

los SPdCEs-NTA- Co^{2+} para enlazar la proteína recombinante a través de su *tag* de histidinas situado en el extremo N-terminal. Estos resultados fueron consistentes con los observados midiendo la resistencia a la transferencia electrónica mediante EIS (**Figura 4.51b**).

4.2.2.2 Optimización de las variables experimentales

Con el fin de que el biosensor de afinidad ofrezca las mejores características analíticas para la determinación de residuos de antibióticos β -lactámicos, se evaluó la influencia de las condiciones experimentales involucradas en su funcionamiento y respuesta. En estos estudios de optimización se tomó como criterio de selección la mejor relación entre las respuestas amperométricas obtenidas en presencia y ausencia de PBP inmovilizada, para disoluciones de leche:P&D (1:1) conteniendo PENG-HRP. Para las variables implicadas en la obtención de las señales amperométricas se emplearon las condiciones previamente optimizadas en el desarrollo del inmunosensor integrado para la determinación de sulfonamidas (*Apartado 4.2.1*).

Evaluación de las adsorciones inespecíficas

En primer lugar se evaluó la existencia de adsorciones inespecíficas del trazador enzimático sobre las superficies modificadas SPdCE-NTA- Co^{2+} , para lo que se compararon las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia de la proteína recombinante y al inmovilizar la PBP sobre los electrodos modificados, tras su incubación con una disolución del trazador enzimático en disolución reguladora P&D. La señal amperométrica obtenida en ausencia de PBP fue sólo un 19% inferior a la obtenida en presencia de la proteína recombinante, lo que confirmó la existencia de adsorciones inespecíficas significativas de PENG-HRP sobre las superficies SPdCE-NTA- Co^{2+} . Con objeto de minimizar estas adsorciones inespecíficas, se comparó la relación entre las respuestas específicas e inespecíficas preparando la disolución de trazador enzimático en diferentes medios: disolución reguladora P&D suplementada con NaCl 1.0 M y leche entera UHT diluida 1:1 con disolución reguladora P&D. Como se observa en la **Figura 4.52** dicha relación aumentó considerablemente trabajando en ambos medios, debido posiblemente a que la presencia de elevadas fuerzas iónicas o de los componentes de la leche minimiza las uniones inespecíficas del trazador enzimático.

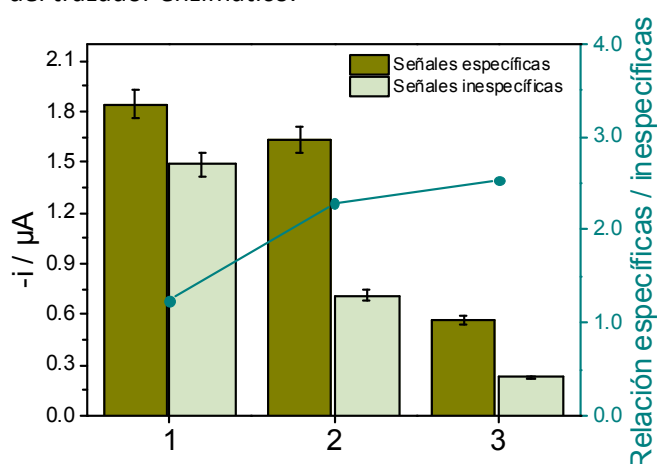


Figura 4.52. Respuestas amperométricas registradas a -200 mV (vs. Ag) para SPdCE-NTA- Co^{2+} (señales inespecíficas) y SPdCE-NTA- Co^{2+} -PBP (señales específicas) tras su incubación con disoluciones de PENG-HRP preparadas en: **1)** disolución reguladora P&D; **2)** disolución reguladora P&D suplementada con NaCl 1.0 M; **3)** leche entera UHT diluida con P&D (1:1). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones entre las señales específicas y las debidas a adsorciones inespecíficas del trazador enzimático.

En vista de estos resultados, se eligió la disolución de leche entera UHT diluida 1:1 con disolución reguladora P&D como medio de trabajo para la optimización de las variables implicadas en la fabricación del biosensor de afinidad. Es importante destacar que en este medio no es necesaria la adición de NaCl 1.0 M para minimizar las adsorciones inespecíficas del conjugado enzimático, debido a las propiedades bloqueantes de los componentes de la matriz láctea ya comentadas.

Funcionalización con derivados del NTA

Se optimizó la concentración de los derivados alquílicos del ácido nitrilotriacético para la funcionalización de los SPdCEs, depositando alícuotas de 5 μL de disoluciones de diversas concentraciones de HS-NTA o LAU-NTA (preparadas en disolución reguladora de carbonato 50 mM, pH 9.6) y dejando incubar durante 3 h. A continuación se depositó una alícuota de 5 μL de CoCl_2 10 mM (en disolución reguladora de acetato 0.1 M, pH 4.5), permitiendo la coordinación durante 20 min y seguidamente se depositó una alícuota de 5 μL de P&D (para la evaluación de las adsorciones inespecíficas) o de PBP 1330 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (en P&D) durante 20 min. Los biosensores de afinidad así preparados se incubaron con disoluciones de PENG-HRP en leche entera UHT diluida 1:1 con P&D durante 30 min. Las concentraciones de los derivados alquílicos de NTA se variaron entre 0.0 y 25 mM (**Figura 4.53**) obteniéndose la mayor relación entre señales específicas e inespecíficas para concentraciones de HS-NTA 1.0 mM y LAU-NTA 3.0 mM. La mayor concentración requerida de este último puede atribuirse probablemente a la menor pureza del reactivo obtenido tras el proceso de síntesis en comparación con la del producto comercial HS-NTA.

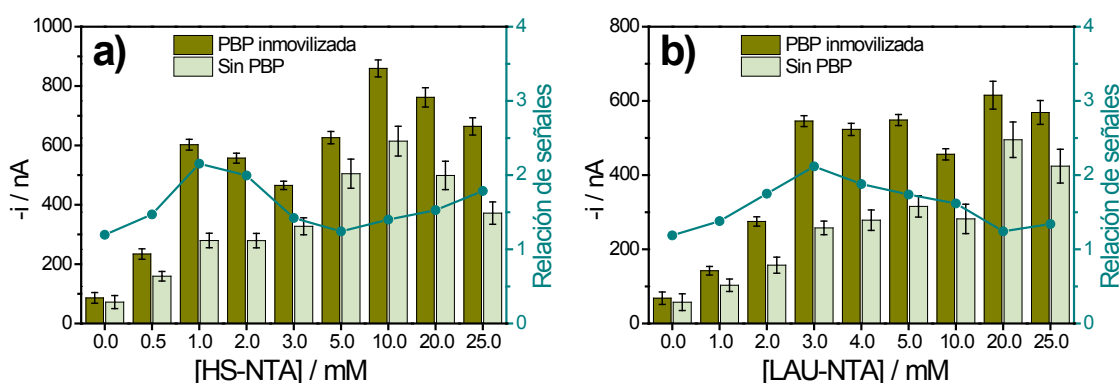


Figura 4.53. Respuestas amperométricas registradas a -200 mV (vs. Ag) para SPdCE-NTA- Co^{2+} (señales inespecíficas) y SPdCE-NTA- Co^{2+} -PBP (señales específicas) tras su incubación con disoluciones de PENG-HRP preparadas en leche entera UHT diluida con P&D (1:1) en la optimización de la cantidad inmovilizada de derivados de NTA: **a)** HS-NTA, **b)** LAU-NTA. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones obtenidas entre las señales específicas e inespecíficas, para cada caso.

De la misma manera se evaluó el tiempo óptimo para la modificación de las superficies electrónicas con HS-NTA durante períodos de tiempo comprendidos entre 30 min y 15 h. Como se observa en la **Figura 4.54** la máxima relación entre señales específicas e inespecíficas se obtuvo trabajando con un período de incubación de 2.5 h. Cabe destacar que esta es una ventaja significativa en comparación con la modificación de electrodos de oro con derivados tiolados del NTA que requiere períodos de incubación comprendidos entre 12 y 24 h para la formación de la monocapa autoensamblada [Lee, 2004; Valiokas, 2008].

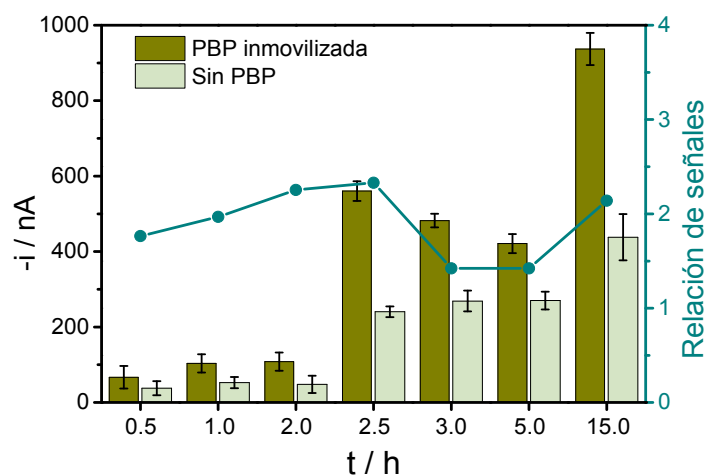


Figura 4.54. Respuestas amperométricas registradas a -200 mV (vs. Ag) para SPdCE-NTA- Co^{2+} (señales inespecíficas) y SPdCE-NTA- Co^{2+} -PBP (señales específicas) tras su incubación con disoluciones de PENG-HRP preparadas en leche entera UHT diluida con P&D (1:1) en la optimización del tiempo de incubación con HS-NTA. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones obtenidas entre las señales específicas e inespecíficas.

Formación de los complejos metálicos

Se evaluaron diferentes iones metálicos para la formación de los complejos de coordinación con los derivados de NTA con que fueron funcionalizados los electrodos. Las especies estudiadas: Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} , fueron los iones metálicos más comúnmente empleados en la modificación de derivados de NTA para la inmovilización de proteínas modificadas con un *tag* de histidinas [Nieba, 1997; Haddour, 2005]. Como se observa en la **Figura 4.55**, se obtuvieron relaciones similares entre señales específicas e inespecíficas para los cationes Cu^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} .

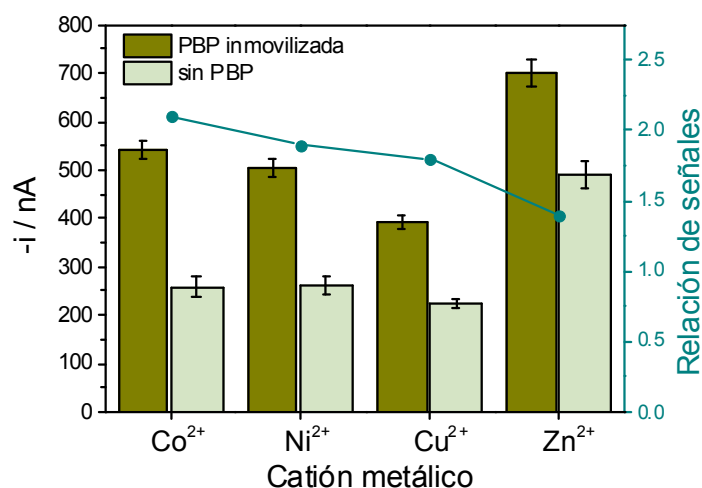


Figura 4.55. Respuestas amperométricas obtenidas a -200 mV (vs. Ag) para SPdCE-NTA- Me^{2+} (señales inespecíficas) y SPdCE-NTA- Me^{2+} -PBP (señales específicas) tras su incubación con disoluciones de PENG-HRP preparadas en leche entera UHT diluida 1:1 con P&D. Los sensores se prepararon con diferentes iones metálicos (en concentración 10.0 mM). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestra también la relación entre señales específicas e inespecíficas.

Para experimentos posteriores se eligió el catión Co^{2+} debido a que su complejo de coordinación con el NTA presenta una menor constante de formación ($\log K = 10.6$) en comparación con Ni^{2+} ($\log K = 11.26$) y Cu^{2+} ($\log K = 12.68$) [Anderegg, 1982], lo que implica una ruptura de los enlaces catión metálico–proteína en condiciones poco drásticas [Matheus, 2007], permitiendo una posible regeneración del sensor de afinidad.

Se estudió también la influencia de la concentración de la disolución de CoCl_2 empleada en la formación de los complejos NTA– Co^{2+} sobre las respuestas amperométricas obtenidas para sensores preparados tanto en presencia como en ausencia de PBP. Como se observa en la **Figura 4.56**, la corriente registrada aumentó al aumentar la concentración de Co(II) , lo que confirmó el papel fundamental del centro metálico en la inmovilización de la PBP mediante la formación del complejo de coordinación. Para concentraciones de la disolución de CoCl_2 superiores a 7.5 mM la señal amperométrica en presencia de PBP permanecía estable, debido a la saturación de los grupos NTA superficiales con el centro metálico, por lo que se eligió ésta concentración para la fabricación de los biosensores de afinidad. Como puede observarse, en ausencia de ion metálico la respuesta amperométrica medida fue similar a la inespecífica, confirmando que la PBP no se inmoviliza en ausencia del catión metálico.

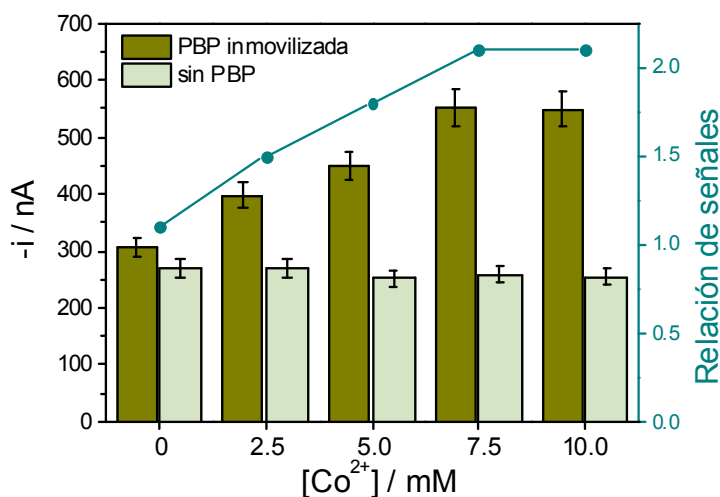


Figura 4.56. Señales amperométricas registradas a -200 mV (vs. Ag) tras incubar sensores preparados empleando diferentes concentraciones de CoCl_2 en ausencia (señales inespecíficas) o en presencia de PBP (señales específicas) con disoluciones de PENG-HRP preparadas en leche entera UHT diluida 1:1 con P&D. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestra también la relación entre señales específicas e inespecíficas.

Se evaluó también el tiempo de incubación de la disolución de CoCl_2 sobre la superficie de los SPdCEs para la formación de los complejos NTA– Co^{2+} . Se estudiaron tiempos comprendidos entre 0 y 60 min, encontrándose un aumento de la señal específica hasta aproximadamente 30 min, estabilizándose para tiempos superiores, por lo que se seleccionó este tiempo de incubación para experimentos posteriores.

Inmovilización de la PBP

Se evaluó la concentración de la disolución de PBP empleada para la modificación de la superficie electródica, variándola entre 440 y 1330 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las señales amperométricas medidas (**Figura 4.57a**) presentaron un incremento significativo con la concentración de PBP hasta una concentración de 660 $\mu\text{g mL}^{-1}$, aumentando muy ligeramente la relación entre señales

específicas e inespecíficas para concentraciones superiores; como solución de compromiso entre las señales amperométricas obtenidas y el consumo de reactivo, para trabajos posteriores se eligió una concentración de $880 \mu\text{g mL}^{-1}$. Se estudió también el tiempo requerido para la inmovilización de la PBP ensayando tiempos de incubación comprendidos entre 0 y 60 min (**Figura 4.57b**), obteniéndose la máxima señal amperométrica para 20 min. Al aumentar el tiempo de incubación disminuyó la relación entre señales específicas e inespecíficas debido a una disminución de las primeras, lo que puede ser debido a la aglutinación de la proteína recombinante con tiempos de incubación largos.

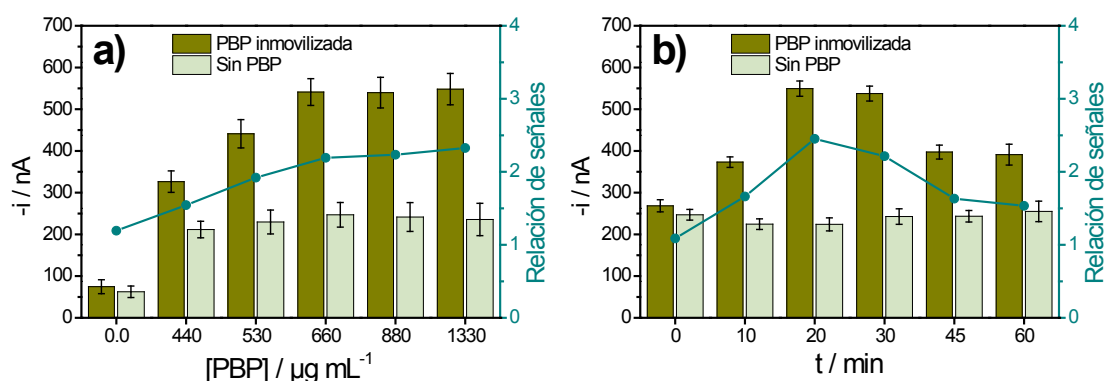


Figura 4.57. Respuestas amperométricas registradas a -200 mV (vs. Ag) para SPdCE-NTA- Co^{2+} (señales inespecíficas) y SPdCE-NTA- Co^{2+} -PBP (señales específicas) tras su incubación con disoluciones de PENG-HRP preparadas en leche entera UHT diluida con P&D (1:1) en la optimización de la cantidad de PBP inmovilizada (**a**) y en el tiempo de incubación (**b**). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones obtenidas entre las señales específicas e inespecíficas, para cada caso.

Optimización del trazador enzimático

La concentración del trazador enzimático se optimizó estudiando la relación entre las señales específicas e inespecíficas en disoluciones de PENG-HRP preparadas por diferente dilución de la disolución del trazador enzimático comercial (de concentración no proporcionada por la casa comercial suministradora). Se ensayaron diluciones comprendidas entre 1/25 y 1/200, obteniéndose la mayor relación entre señales específicas e inespecíficas para diluciones inferiores a 1/50 (**Figura 4.58**), por lo que se seleccionó ésta para experimentos posteriores.

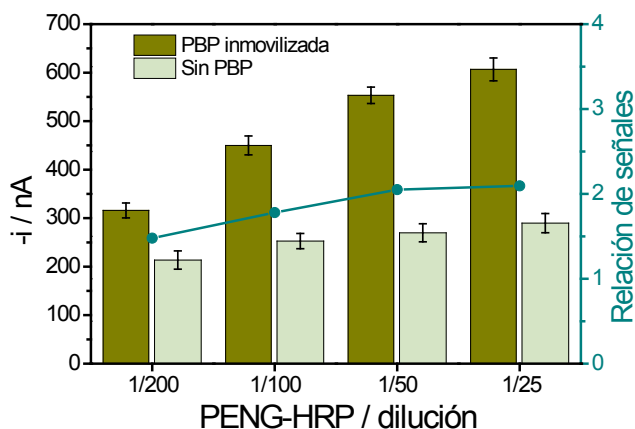


Figura 4.58. Señales amperométricas registradas a -200 mV (vs. Ag) tras incubar sensores preparados en ausencia (señales inespecíficas) o presencia de PBP (señales específicas) con disoluciones de diferentes concentraciones de PENG-HRP preparadas en leche entera UHT diluida 1:1 con P&D. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestra también la relación entre señales específicas e inespecíficas.

4.2.2.3 Características analíticas del biosensor de afinidad

El funcionamiento analítico de este biosensor integrado de afinidad se evaluó empleando AMP como penicilina modelo. En primer lugar se evaluaron las características analíticas del biosensor en disolución reguladora; en la **Figura 4.59** se muestra la curva de calibrado obtenida en la disolución reguladora P&D suplementada con NaCl 1.0 M. La curva de calibrado presentó el hábito característico de un formato competitivo, con un ID comprendido entre (1.3 ± 0.2) y (9.9 ± 0.9) ng mL⁻¹, un IC₅₀ de (3.6 ± 0.4) ng mL⁻¹ y un LD de (0.7 ± 0.1) ng mL⁻¹, aproximadamente seis veces inferior al LMR establecido por la legislación Europea (4 µg kg⁻¹ para AMP en muestras de leche).

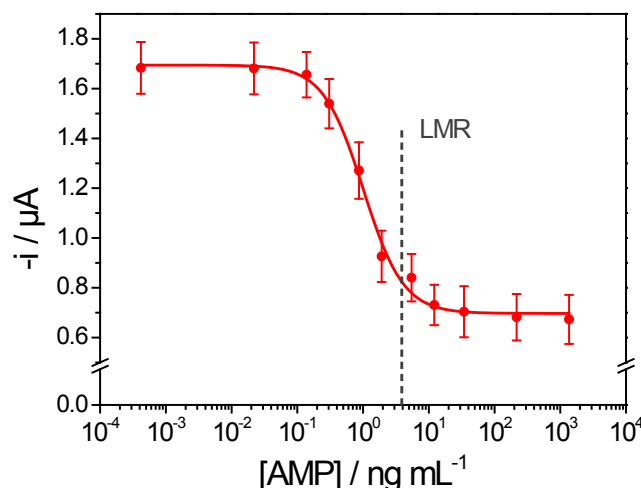


Figura 4.59. Curva de calibrado obtenida con el biosensor de afinidad desarrollado para AMP en P&D suplementado con NaCl 1.0 M. $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se indica el LMR establecido por la legislación Europea para AMP en leche.

4.2.2.4 Características analíticas del sensor de afinidad en leche

El comportamiento analítico del biosensor de afinidad en leche se evaluó seleccionando como analitos modelo AMP (una penicilina) y CEF (una cefalosporina). Para ambos compuestos se construyeron curvas de calibrado en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con disolución reguladora P&D, conteniendo la concentración optimizada de trazador enzimático. Las curvas de calibrado obtenidas se muestran en la **Figura 4.60** y las características analíticas derivadas de las mismas se resumen en la **Tabla 4.11**. Como se puede observar, en ambos casos los LDs alcanzados son muy inferiores a los LMRs establecidos por la legislación, por lo que el biosensor propuesto puede ser aplicado a la determinación de residuos de antibióticos β -lactámicos en leche.

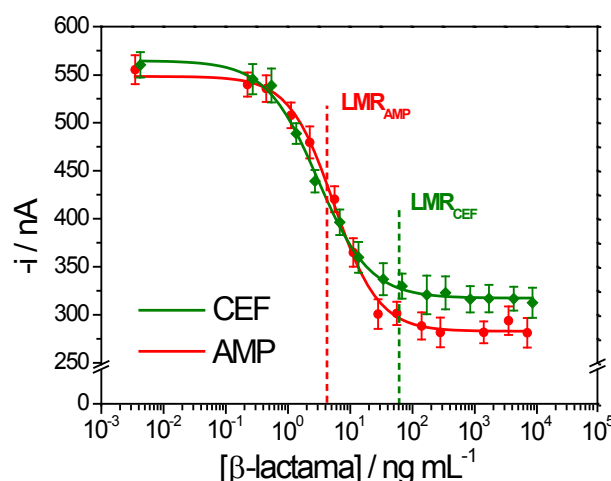


Figura 4.60. Curvas de calibrado obtenidas con el biosensor de afinidad desarrollado (SPdCE-NTA- Co^{2+} -PBP) para AMP y CEF en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con P&D. $E_{\text{ap}} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se indican los LMRs establecidos por la legislación Europea para ambos antibióticos en leche.

Tabla 4.11. Características analíticas de las curvas de calibrado construidas con el biosensor de afinidad desarrollado para AMP y CEF en disoluciones de leche:P&D (1:1).

	AMP	CEF
r^2	0.996	0.997
$\text{IC}_{50} / \text{ng mL}^{-1}$	5.5 ± 0.1	3.0 ± 0.1
$\text{ID} / \text{ng mL}^{-1}$	1.73 ± 0.04 a 17.2 ± 0.4	0.80 ± 0.02 a 11.3 ± 0.3
$\text{LD} / \text{ng mL}^{-1}$	0.89 ± 0.02	0.37 ± 0.01
$\text{LMR} / \mu\text{g kg}^{-1}$	4	60

La reproducibilidad de las respuestas analíticas obtenidas con diferentes biosensores preparados de la misma manera se evaluó tanto para sensores de afinidad preparados el mismo día como preparados en días diferentes, realizando las medidas amperométricas después de la incubación de los mismos con disoluciones de leche entera UHT (en ausencia de antibióticos β -lactámicos) diluidas 1:1 con P&D, conteniendo la concentración optimizada de PENG-HRP. Se obtuvieron valores de RSD del 4.6 % para seis sensores diferentes preparados el mismo día y del 5.7 % para cinco biosensores preparados en días diferentes. Estos resultados demostraron una buena reproducibilidad en el proceso de fabricación de los biosensores de afinidad.

Se evaluó también la estabilidad de almacenamiento de los biosensores integrados, preparando el mismo día diferentes SPdCEs modificados con HS-NTA- Co^{2+} -PBP, que se almacenaron en seco a 4 °C. La respuesta de estos sensores se evaluó periódicamente tras su incubación en disoluciones de PENG-HRP preparadas en leche:P&D (1:1). En la **Figura 4.61** se muestra el gráfico de control construido tomando como valor central el valor medio obtenido para las cinco medidas amperométricas realizadas el primer día del estudio y como límites de control superior e inferior el triple de la desviación estándar de estas cinco medidas. Las respuestas amperométricas obtenidas permanecieron dentro de los límites de control durante 8 días, sin pérdida apreciable de la sensibilidad original en este periodo y manteniendo el 91.2 % de la misma después de 11 días.

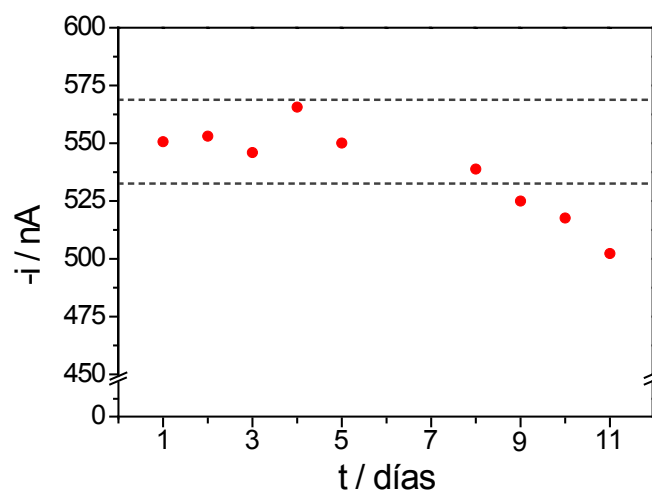


Figura 4.61. Gráfico de control construido para el estudio de estabilidad de los biosensores de afinidad desarrollados SPdCE-HS-NTA-Co²⁺-PBP, almacenados en seco a 4 °C. Las señales corresponden a las medidas amperométricas realizadas a -200 mV (vs. Ag) tras la incubación de estos sensores en disoluciones de leche:P&D (1:1) conteniendo PENG-HRP y en ausencia de antibióticos β -lactámicos.

4.2.2.5 Selectividad del biosensor de afinidad desarrollado

La selectividad del biosensor de afinidad desarrollado se evaluó frente a tres antimicrobianos representativos de otras familias de antibióticos potencialmente interferentes (TC, SPY y ENRO). En la **Figura 4.62** se muestran las señales amperométricas obtenidas con el sensor de afinidad en ausencia y en presencia de estos antibióticos a dos niveles de concentración diferentes (0.5 y 10 μ M), en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con P&D.

Los resultados obtenidos demostraron la inexistencia de reactividad cruzada significativa para los tres antibióticos no β -lactámicos evaluados, incluso en presencia de un gran exceso (10 μ M) de los mismos. Los porcentajes de reactividad cruzada calculados de acuerdo a la *Ecuación (4)* fueron en todos los casos < 1 %, indicando una excelente especificidad frente a la familia de antibióticos β -lactámicos de la PBP empleada en la fabricación de los sensores de afinidad.

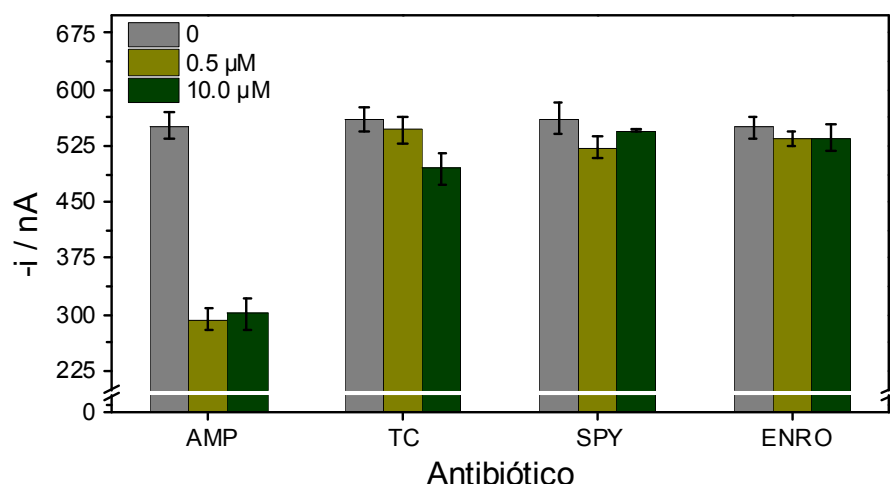


Figura 4.62. Estudio de la selectividad del biosensor de afinidad desarrollado frente a tres antibióticos potencialmente interferentes (TC, SPY y ENRO). Se muestran las señales amperométricas obtenidas tras incubar los sensores en disoluciones de leche:P&D (1:1) conteniendo PENG-HRP y el antibiótico analizado en concentración 0, 0.5 ó 10.0 μM . A modo de comparación se muestran también las señales obtenidas para AMP. $E_{\text{ap}} = -200 \text{ mV}$ (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$).

Bajo el esquema propuesto se comprobó también que la PBP en el biosensor de afinidad desarrollado sólo era sensible a la forma activa de los antibióticos. Este estudio se realizó enriqueciendo disoluciones de leche con los antibióticos AMP o CEF hidrolizados según el protocolo descrito en el *Apartado 3.4.12*, a dos niveles de concentración: 10^2 y 10^3 ng mL^{-1} . Como se muestra en la **Figura 4.63**, tras el análisis de leche con antibióticos β -lactámicos hidrolizados, no se obtuvo una competición significativa a ninguno de los niveles de concentración ensayados, demostrando que no existe reactividad cruzada frente a las β -lactamas hidrolizadas e indicando que el sensor de afinidad sólo detecta las formas activas de los residuos de estos antibióticos.

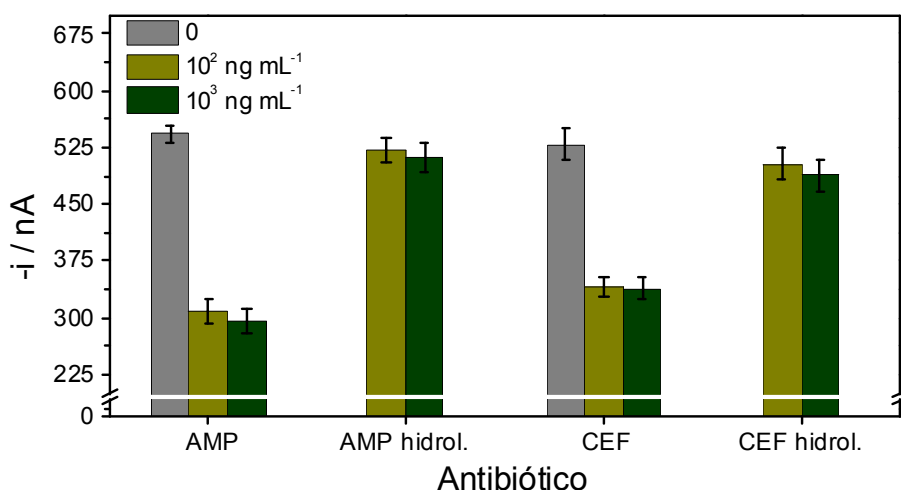


Figura 4.63. Señales amperométricas obtenidas en el estudio de la selectividad del biosensor de afinidad desarrollado frente a antibióticos β -lactámicos hidrolizados (AMP y CEF hidrol.). Se muestran las señales amperométricas obtenidas tras incubar los sensores en disoluciones de leche:P&D (1:1) en ausencia de antibióticos, conteniendo PENG-HRP y dos niveles de concentración de las especies analizadas. A modo de comparación se muestran también las señales obtenidas para AMP y CEF sin hidrolizar. $E_{\text{ap}} = -200 \text{ mV}$ (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$).

4.2.2.6 Determinación de antibióticos β -lactámicos en leche

El biosensor amperométrico de afinidad desarrollado se aplicó al análisis de leche entera UHT enriquecida con AMP a un nivel de concentración de 10 ng mL^{-1} . La cuantificación de AMP se realizó mediante interpolación de los valores de intensidad de corriente registrados en la curva de calibrado construida para este antibiótico en la misma matriz (**Figura 4.60**). Tras analizar diez muestras diferentes se obtuvo una concentración media de AMP de $(10.8 \pm 0.8) \text{ ng mL}^{-1}$, una recuperación media de $(103 \pm 8) \%$ y una RSD = 9.9 %, a un nivel de probabilidad del 95 %. Los buenos resultados obtenidos demostraron la utilidad del sensor de afinidad desarrollado para la determinación de antibióticos β -lactámicos en muestras de leche en un tiempo total de ensayo de aproximadamente 30 minutos (una vez que los biosensores han sido preparados).

4.2.2.7 Reutilización de los sensores de afinidad

Con el fin de evaluar la posible reutilización de los biosensores en caso de ser necesario, se verificó la reversibilidad de la inmovilización orientada de la Histag-PBP sobre los electrodos funcionalizados con NTA- Co^{2+} . Para ello, se midieron las respuestas amperométricas obtenidas con cuatro electrodos diferentes tras su incubación con disoluciones de PENG-HRP preparadas en leche:P&D (1:1) y después de lavarlos durante 3 h en disolución reguladora de fosfato 50 mM (pH 8.0) conteniendo NaCl 300 mM, imidazol 300 mM y Tween®20 al 0.01 % y a continuación durante 40 min en agua desionizada. Este medio es el recomendado por diversas casas comerciales [**Clontech Lab., 2012; Life Tech. Corp., 2013^b**] para la elución de proteínas que incorporan un *tag* de histidinas en procesos de purificación por afinidad metal-ligando. En la **Figura 4.64** se comparan las señales amperométricas registradas, observándose que la corriente media obtenida después de la etapa de lavado fue similar a la registrada en ausencia del trazador enzimático, lo que se atribuyó al desplazamiento de la PBP por el imidazol y como consecuencia, la pérdida de PENG-HRP enlazada a la superficie electródica. Tras repetir los protocolos de coordinación al catión metálico, inmovilización de la PBP y reconocimiento de la PENG-HRP con estos sensores regenerados se recuperó de nuevo la respuesta amperométrica inicial, demostrando la especificidad y reversibilidad de este tipo de inmovilización de biomoléculas.

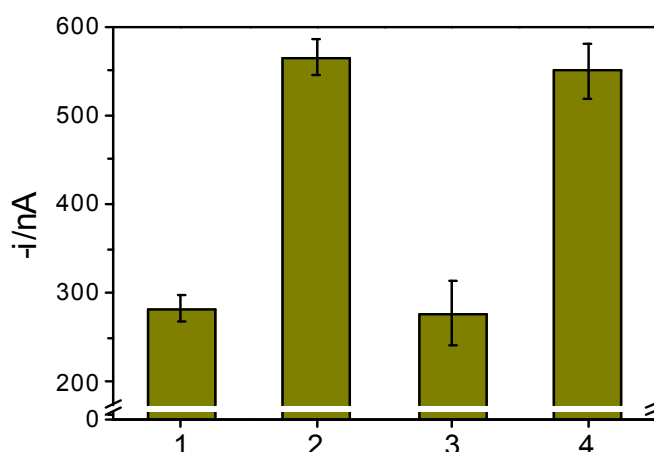


Figura 4.64. Señales amperométricas registradas a -200 mV (vs. Ag) en el estudio de reutilización de las plataformas SPdCE-NTA para la determinación de antibióticos β -lactámicos. Se representan los valores medios de las señales amperométricas registradas para: **1)** SPdCEs-NTA- Co^{2+} -PBP; **2)** tras la incubación de estos sensores de afinidad en una disolución de PENG-HRP preparada en leche:P&D (1:1); **3)** tras las etapas de lavado en disolución reguladora de fosfato 50 mM conteniendo NaCl 300 mM, imidazol 300 mM y Tween®20 al 0.01 % y en agua desionizada; **4)** tras la incubación de los electrodos regenerados con disoluciones de Co^{2+} , PBP y PENG-HRP de acuerdo con los protocolos optimizados. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=4$).

4.2.2.8 Conclusiones

Este trabajo ha demostrado por primera vez la modificación simple, rápida y reproducible de electrodos serigrafiados de carbono con una monocapa de derivados alquílicos de NTA de cadena larga, constituyendo una novedosa plataforma para el desarrollo de biosensores de afinidad mediante una inmovilización reproducible, estable, reversible y orientada de proteínas recombinantes modificadas con un *tag* de histidinas. La modificación propuesta presenta ventajas considerables frente a otros métodos comúnmente empleados para la modificación de superficies electródicas con este tipo de química superficial, como la generación de monocapas autoensambladas de tioles sobre superficies de oro que requiere largos tiempos de incubación. El potencial de esta innovadora plataforma se ha demostrado a través de la inmovilización de una PBP recombinante conduciendo al desarrollo de un biosensor integrado de afinidad muy atractivo para la detección específica y sensible de antibióticos β -lactámicos en leche.

La caracterización exhaustiva del comportamiento de este biosensor ha demostrado su selectividad de respuesta únicamente frente a formas activas de antibióticos pertenecientes a la familia de antibióticos β -lactámicos.

La inmovilización reversible de la proteína recombinante a través de su *tag* de histidinas presenta la ventaja de poder reutilizar las plataformas modificadas tras una simple elución de la proteína, además de permitir una inmovilización reproducible y orientada, con el sitio de reconocimiento en una disposición de fácil acceso a los analitos y al trazador enzimático que garantiza una eficiencia máxima en el proceso de reconocimiento.

Los resultados obtenidos demostraron la capacidad del biosensor desarrollado para la detección y cuantificación de bajas concentraciones de residuos de antibióticos β -lactámicos, tanto penicilinas como cefalosporinas en leche de manera fiable, específica, rápida y sin necesidad de aplicar tratamientos de muestra complejos.

4.3 Comparación de metodologías

Cuando se comparan los biosensores desarrollados para la determinación de sulfonamidas se observa que los procedimientos de fabricación empleados tanto para el magnetoinmunosensor (*Apartado 4.1.2*) como para el inmunosensor integrado (*Apartado 4.2.1*) fueron fiables y permitieron la preparación de biosensores reproducibles, como demuestran los valores de RSD obtenidos en ambos casos tanto para sensores preparados el mismo día como en días diferentes. Además, el anticuerpo empleado para los ensayos competitivos en ambas metodologías presentó una marcada selectividad frente a la familia de las sulfonamidas en comparación con otros antibióticos potencialmente interferentes, lo que permitió la adecuada determinación de residuos de antibióticos pertenecientes a la familia de las sulfonamidas en leche, siendo capaces de detectar tanto la presencia de especies individuales como de mezclas de las mismas en cumplimiento con el LMR establecido por la legislación Europea vigente para esta familia de antimicrobianos.

En cuanto a los biosensores desarrollados para la determinación de antibióticos β -lactámicos, debido a que se empleó una PBP recombinante como elemento de biorreconocimiento tanto en las metodologías que implican los magnetobiosensores de afinidad (*Apartado 4.1.3*) como los biosensores integrados (*Apartado 4.2.2*), en ambos casos se obtuvo una marcada selectividad frente a esta familia de antibióticos en relación con otros antimicrobianos potencialmente interferentes. Se observó también tanto el reconocimiento de penicilinas como de cefalosporinas, grupos pertenecientes a la familia de antibióticos β -lactámicos y que presentan estructuras básicas diferentes, pero ambas incorporando el anillo β -lactámico a través del cual son enlazadas por la PBP. Además fue posible la detección sólo de aquellas especies con su anillo β -lactámico intacto, aspecto relevante en la determinación de esta familia de residuos antimicrobianos a sus LMRs en cumplimiento con la legislación Europea vigente.

Los sensores preparados en ambas metodologías presentaron una estabilidad similar, permaneciendo las señales amperométricas registradas dentro de los límites de los gráficos de control construidos, durante nueve días para el magnetosensor y durante ocho días para el biosensor integrado. En los procedimientos de fabricación se obtuvieron también reproducibilidades similares, presentando los magnetosensores valores de RSD del 5.1 y 6.6 % y los biosensores integrados del 4.6 y 5.7 %, en ambos casos para sensores preparados el mismo día y en días diferentes, respectivamente.

Por otra parte, cuando se compara la amplitud del intervalo dinámico y la sensibilidad alcanzada con los magnetosensores y con los sensores integrados, en principio, sería de esperar una mayor sensibilidad en las metodologías que implican el uso de partículas magnéticas debido a la mayor eficiencia de la reacción de reconocimiento, la minimización de las posibles interferencias de la matriz y las rápidas cinéticas de enlace al utilizar MBs como sustratos para la inmovilización de receptores biológicos [Stanciu, 2009; Pedrero, 2012]. Sin embargo, como se observa en la **Tabla 4.12** para los biosensores de sulfonamidas, aunque las características

analíticas obtenidas con las dos estrategias resultaron atractivas para la determinación de esta familia de antibióticos, es con el inmunosensor integrado con el que se obtienen un intervalo dinámico más amplio y un menor LD.

Tabla 4.12. Comparación de las características analíticas obtenidas con el magnetoinmunosensor y el inmunosensor integrado desarrollados para la determinación de sulfonamidas, en la determinación de SPY en leche entera UHT diluida con PBST (1:1).

SPY	Inmunosensor integrado	Magnetoinmunosensor
r^2	0.996	0.992
IC_{50} / ng mL ⁻¹	14 ± 1	12.27 ± 0.04
ID / ng mL ⁻¹	1.6 ± 0.1 a 118 ± 9	3.08 ± 0.01 a 48.9 ± 0.2
LD / ng mL ⁻¹	0.44 ± 0.04	1.369 ± 0.005

Las mismas conclusiones pueden extraerse cuando se comparan las características analíticas de los biosensores de afinidad desarrollados para la determinación de antibióticos β -lactámicos. La **Tabla 4.13** muestra como para AMP en leche diluida 1:1 con disolución reguladora P&D, el biosensor de afinidad integrado permitió alcanzar un límite de detección mucho menor y realizar la determinación de dicho antibiótico a bajas concentraciones.

Tabla 4.13. Comparación de las características analíticas derivadas de las curvas de calibrado construidas para AMP con el biosensor integrado y el magnetosensor de afinidad en disoluciones de leche:P&D (1:1).

AMP	Biosensor integrado	Magnetobiosensor
r^2	0.996	0.995
IC_{50} / ng mL ⁻¹	5.5 ± 0.1	46 ± 6
ID / ng mL ⁻¹	1.73 a 17.2	23.0 a 88.4
LD / ng mL ⁻¹	0.89 ± 0.02	14.0 ± 0.7

Este comportamiento observado, que implica una mejor sensibilidad de los biosensores integrados en comparación con los magnetosensores puede atribuirse a la menor cantidad de receptores biológicos (antiSPY y PBP) inmovilizados sobre las superficies electródicas en los sensores integrados, lo que favorece que una menor concentración de analito produzca una competición considerable para las concentraciones establecidas de trazadores enzimáticos. Además, el proceso de inmovilización de dichos biorreceptores permite la minimización de los impedimentos estéricos que pueden afectar a la eficiencia de la reacción de reconocimiento.

En cualquier caso, tanto el magnetoinmunosensor como el inmunosensor integrado permitieron la determinación de residuos de sulfonamidas en leche a niveles de concentración inferiores al LMR establecido. Sin embargo, en el caso de los biosensores desarrollados para antibióticos β -lactámicos, la determinación de antibióticos que presentan LMRs establecidos a bajos niveles de concentración (4 μ g kg⁻¹) sólo fue posible con el biosensor de afinidad integrado.

4.4 Otras estrategias analíticas

En este trabajo se ha hecho uso de técnicas electroquímicas que no se suelen utilizar de forma convencional con fines analíticos pero que han mostrado una cierta aplicabilidad a la detección de residuos de antibióticos. Estas técnicas son la microscopía electroquímica de barrido (*Scanning Electrochemical Microscopy*, SECM) y la construcción de células de biocombustible (BFCs). El objetivo fundamental al desarrollar estas estrategias es evaluar dicha aplicabilidad de un modo genérico, particularizando para el problema analítico que se ha abordado en esta Tesis. Estos trabajos se realizaron durante una estancia de investigación en el grupo Analytische Chemie – Elektroanalytik & Sensorik, de la Ruhr Universität Bochum, bajo la dirección del Prof. Dr. Wolfgang Schuhmann.

4.4.1 Microscopía electroquímica de barrido (SECM)

La SECM [Bard, 2001; Fan, 2007] es una técnica capaz de proporcionar información electroquímica acerca de la reactividad superficial a escala microscópica, al barrer la superficie objeto de estudio con una sonda y registrar una respuesta adecuada. Esta técnica se ha aplicado a la detección y cuantificación de SPY utilizando un formato de ensayo competitivo directo con los anticuerpos selectivos antiSPY inmovilizados sobre placas de carbono vitrificado y empleando los modos generación/recolección y *feedback* en SECM como metodologías de transducción. En el primer caso se monitorizó la reducción de benzoquinona (BQ) generada en la reducción de H_2O_2 , catalizada por la enzima HRP en presencia de HQ, mientras que en el segundo, la competición entre el microelectrodo y la placa modificada por la oxidación de la sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ permitió la visualización de regiones con nanopartículas de plata tras su deposición catalizada enzimáticamente.

Las inmunoplateformas analizadas por SECM se construyeron de forma análoga al inmunosensor integrado para la determinación de sulfonamidas descrito en el *Apartado 4.2.1*, incorporando proteína G unida covalentemente a la superficie de carbono para la inmovilización orientada de los anticuerpos antiSPY. Las inmunoplateformas se fabricaron modificando placas de carbono vitrificado según el procedimiento descrito en el *Apartado 3.4.9*, incubándolas posteriormente con diferentes mezclas de competición SPY/SPY-HRP en leche diluida 1:1 con PBST (**Figura 4.65**). Siguiendo el esquema competitivo utilizado, el antibiótico SPY en leche compitió con una concentración establecida del trazador enzimático SPY-HRP por el limitado número de sitios de enlace de los anticuerpos inmovilizados sobre la superficie de carbono.

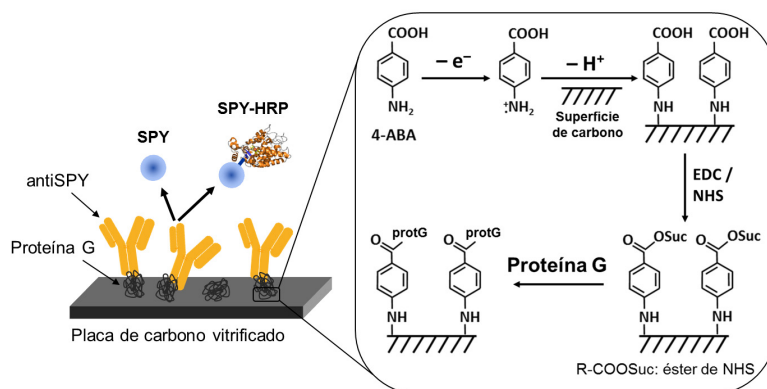


Figura 4.65. Detalles de la química superficial implicada en el inmunoensayo para detección de SPY mediante SECM, incluyendo la modificación de la placa de carbono vitrificado con 4-ABA, la unión covalente de ProtG mediante activación con EDC/NHS y la inmovilización de los anticuerpos, así como el ensayo competitivo realizado.

4.4.1.1 Caracterización de los ultramicroelectrodos

En primer lugar se caracterizaron los ultramicroelectrodos (UMEs) de fibra de carbono empleados como sondas en los experimentos de SECM. Sobre un UME sumergido en una disolución que contiene una especie electroactiva *Ox*, polarizado a un potencial suficientemente negativo respecto al potencial formal del par redox *Ox/Red*, se produce la reducción de *Ox* a una velocidad controlada por difusión, obteniéndose una corriente catódica en estado estacionario i_{∞} , que depende de la concentración de *Ox* (C^*), de su coeficiente de difusión (*D*) y que obedece a la siguiente ecuación [Fan, 2007]:

$$i_{\infty} = 4nFDaC^* \quad (8)$$

siendo *n* el número de electrones implicados en la reacción redox, *F* la constante de Faraday y *a* el radio del UME.

Con objeto de determinar el diámetro efectivo de los electrodos empleados, se realizaron barridos voltamperométricos cíclicos en una disolución de $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ en un intervalo de potenciales comprendido entre 0.0 y -400 mV (vs. Ag/AgCl). A modo de ejemplo, en la **Figura 4.66** se muestra uno de los barridos voltamperométricos obtenidos.

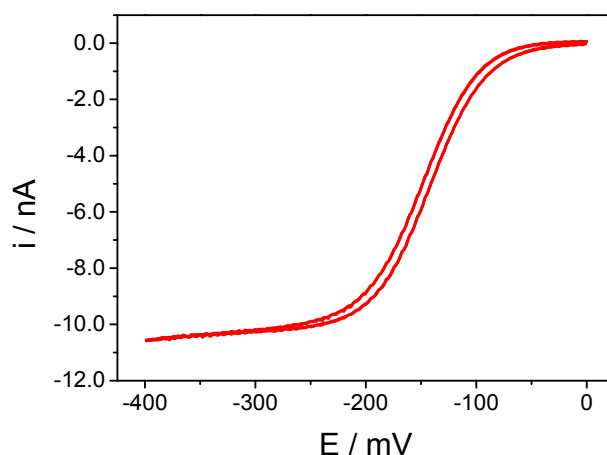


Figura 4.66. Voltamperograma cíclico para $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ 5 mM conteniendo KCl 100 mM registrado con un UME de fibra de carbono en la ventana de potencial comprendida entre 0.0 a -400 mV (vs. Ag/AgCl); $\nu = 50$ mV s⁻¹.

A partir de la corriente de reducción en el estado estacionario obtenida en los barridos voltamperométricos para los diferentes electrodos y de acuerdo a la ecuación descrita anteriormente, con $C^* = 5 \text{ mM}$ y $D = 8.43 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (coeficiente de difusión en medio KCl 100 mM [Wang, 2011]), el radio medio de los UMEs resultó ser de $(6 \pm 2) \mu\text{m}$.

4.4.1.2 Modo generación/recolección: Monitorización de BQ

Aunque en SECM el modo *feedback* permite obtener una mayor resolución [Bard, 2001; Fan, 2007], el modo generación/recolección (G/C) en el que el sustrato analizado es la superficie generadora y el UME ejerce de superficie recolectora, es más sensible dado que la corriente de fondo registrada con el UME es prácticamente despreciable. Así, en un primer esquema se analizó la placa de carbono vitrificado modificada, sobre la que se realizó el inmunoensayo competitivo para la detección de SPY en leche. Para ello se monitorizó la BQ generada en la oxidación del mediador redox HQ en el proceso de reducción del sustrato enzimático H_2O_2 catalizado por la enzima HRP, como se muestra en la **Figura 4.67**.

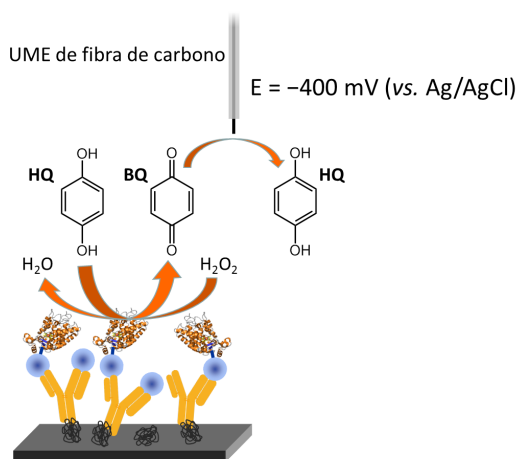


Figura 4.67. Representación esquemática detallando el principio del modo muestra generadora/sonda recolectora empleado en SECM para la detección y cuantificación de residuos del antibiótico SPY.

Comportamiento electroquímico del sistema HQ/BQ sobre el microelectrodo de fibra de carbono

La HQ fue elegida como mediador redox para el sistema enzima-sustrato HRP- H_2O_2 debido a las excelentes propiedades electroquímicas de su producto de oxidación BQ, que presenta un comportamiento cuasi-reversible y ocasiona un ensuciamiento despreciable del electrodo [Zhang, 2006; Fan, 2013]. Aunque se han utilizado UMEs de diferentes materiales para la monitorización de la reducción de BQ en SECM [Li, 2007; Roberts, 2011; Zhang, 2006], a potenciales catódicos lo suficientemente elevados puede ocurrir la reducción de O_2 y H_2O_2 catalizada por superficies de metales nobles como oro o platino [Katsounaros, 2012]. Como se muestra en la **Figura 4.68**, al comparar los voltamperogramas cíclicos para una disolución de BQ 1 mM en ausencia y en presencia de H_2O_2 1 mM, mientras que la reducción catalítica de H_2O_2 se observó sobre un UME de platino a potenciales más negativos de -200 mV (vs. Ag/AgCl), dicho proceso no se observó sobre un UME de fibra de carbono, por lo que se eligió éste último para realizar el trabajo experimental.

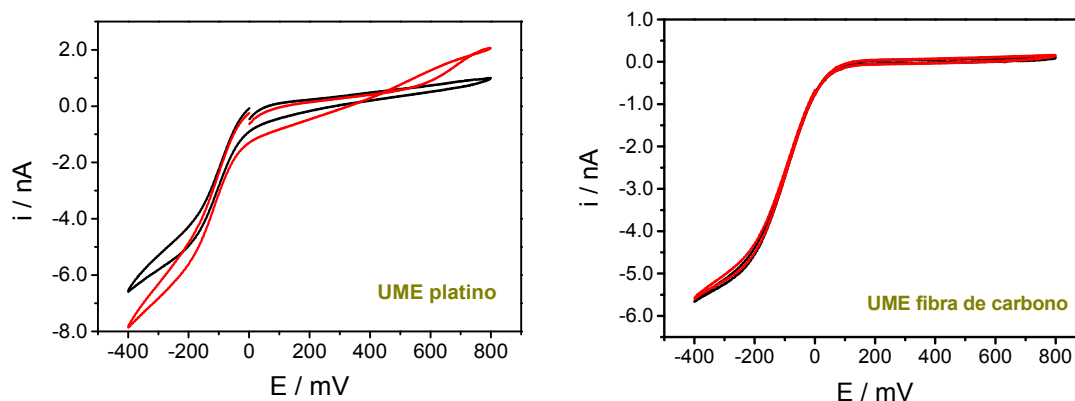


Figura 4.68. Voltamperogramas cíclicos obtenidos sobre UMEs de platino y de fibra de carbono para BQ 1 mM (—) y BQ 1 mM + H₂O₂ 1 mM (—). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Potenciales referidos a un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 3 M.

En la **Figura 4.69** se muestra un voltamperograma cíclico obtenido con el UME de fibra de carbono para una disolución de BQ 1 mM + HQ 1 mM en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.0), en la que se aprecia una corriente de reducción en estado estacionario para BQ a potenciales más negativos de -200 mV y una corriente de oxidación en estado estacionario para HQ a potenciales más positivos de 600 mV (vs. Ag/AgCl, en ambos casos). De acuerdo con este comportamiento, en los experimentos de SECM, el microelectrodo se polarizó a 800 mV para las aproximaciones previas a las superficies modificadas en una disolución de HQ, mientras que para el análisis de estas superficies el UME se polarizó a -400 mV para la reducción de la BQ generada por el conjugado SPY-HRP inmovilizado.

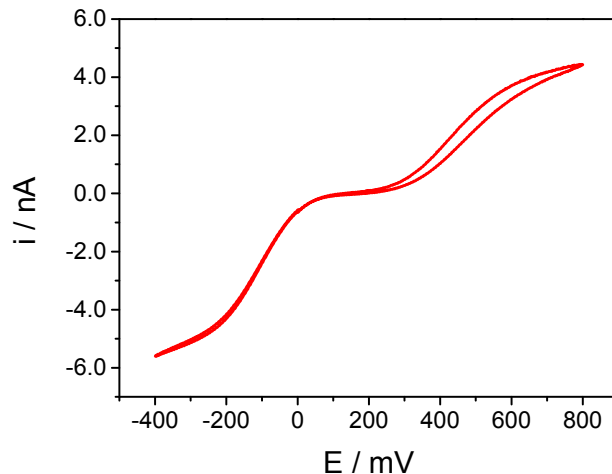


Figura 4.69. Voltamperograma cíclico obtenido con un UME de carbono en una disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.0), conteniendo HQ 1 mM y BQ 1 mM. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Potenciales referidos a un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 3 M.

Curvas de aproximación en dirección z hacia las superficies modificadas

Con objeto de posicionar la sonda de SECM en una disposición próxima a la superficie de la inmunoplateforma antes de realizar el análisis para evaluar la presencia del conjugado SPY-HRP inmovilizado sobre la misma, se trabajó con una disolución de HQ 2 mM, polarizando el

UME a 800 mV (vs. Ag/AgCl) y registrando la corriente de oxidación durante la aproximación del mismo a una velocidad constante hacia el sustrato a analizar. Al observarse una disminución drástica de la corriente de oxidación registrada se detuvo el microelectrodo, evitando así cualquier posible deterioro de la inmunoplateforma o del UME y se replegó 100 μm desde esta posición en el eje z. A continuación se añadió a la célula electroquímica un volumen de H_2O_2 2 mM correspondiente al mismo volumen adicionado anteriormente de la disolución de HQ, obteniéndose así una disolución HQ 1 mM + H_2O_2 1 mM, en la que se registraron las curvas de aproximación hacia la inmunoplateforma analizada y el barrido superficial de la misma.

Bajo el esquema propuesto en el modo G/C de la SECM las especies electroactivas generadas en los centros enzimáticos difunden desde la superficie modificada y son detectadas por el microelectrodo. Así, al situar la sonda directamente sobre una región de la inmunoplateforma con enzima activa inmovilizada, la corriente faradaica registrada con el UME aumenta a medida que éste se aproxima a la superficie modificada. Como se puede observar en la **Figura 4.70**, la corriente catódica registrada aumentó hasta un máximo tras el cual presentó una disminución considerable. El incremento en la corriente se puede explicar debido a la generación de BQ en la reacción enzimática. Puesto que la velocidad a la que las moléculas de BQ difunden desde la superficie es menor que la velocidad a la que son producidas por la enzima, la concentración de BQ en las cercanías de la HRP es mayor que en el seno de la disolución, estableciéndose un gradiente de concentración [Roberts, 2011]. No obstante, cuando el UME se sitúa muy próximo a la superficie analizada, la difusión de las moléculas de BQ a la superficie del mismo queda impedida de acuerdo al efecto *feedback* negativo característico en SECM, resultando en una disminución de la corriente catódica registrada.

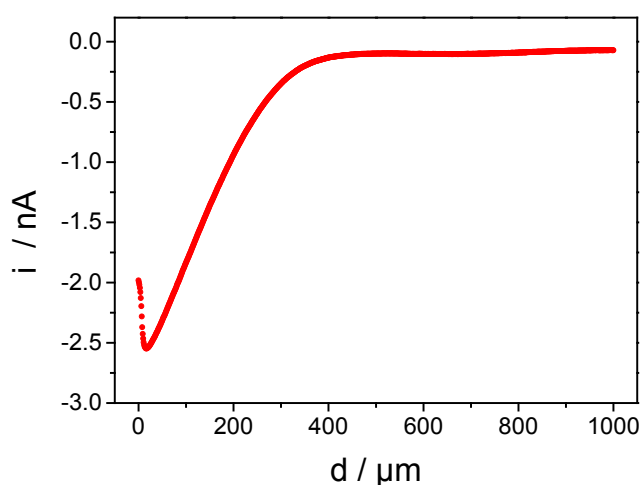


Figura 4.70. Curva de aproximación en dirección z registrada sobre una región de la inmunoplateforma analizada con SPY-HRP inmovilizada. $E_{\text{UME}} = -400$ mV (vs. Ag/AgCl). Medio: disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.0), conteniendo HQ 1 mM y H_2O_2 1 mM. Velocidad de aproximación: 20 $\mu\text{m s}^{-1}$.

Cuantificación de SPY en leche

Empleando SPY como sulfonamida modelo se evaluó la posibilidad de cuantificar los residuos de este antibiótico en leche con el sistema propuesto, para lo que se registraron curvas de aproximación con el microelectrodo posicionado sobre regiones de la inmunoplateforma analizada, en las que se incubaron diferentes mezclas de competición SPY/SPY-HRP, preparadas conteniendo una concentración establecida del trazador enzimático y concentraciones variables

de SPY, en leche diluida 1:1 con PBST. Según se observa en la **Figura 4.71**, las intensidades de corriente catódica registradas disminuyeron al aumentar la concentración de SPY en la mezcla de competición. Se registró también una curva de aproximación con el microelectrodo posicionado sobre una región de la placa que no fue incubada previamente con SPY o SPY-HRP, no observándose incremento alguno en la corriente registrada con el microelectrodo y corroborando que dicho incremento fue únicamente debido a la reducción de la BQ producida en la reducción del H_2O_2 catalizada por la HRP.

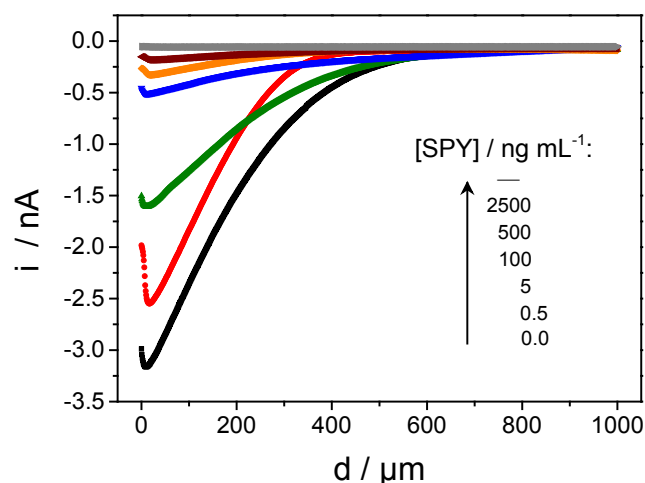


Figura 4.71. Ejemplos de curvas de aproximación en la dirección z registradas sobre regiones de la inmunoplateforma en las que se incubaron diferentes disoluciones de mezclas de competición SPY/SPY-HRP con concentraciones variables de SPY. La curva de aproximación indicada en gris corresponde a la obtenida al aproximar el microelectrodo a una región de la inmunoplateforma sin incubar con SPY o SPY-HRP. $E_{\text{UME}} = -400$ mV (vs. Ag/AgCl). Medio: disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.0), conteniendo HQ 1 mM y H_2O_2 1 mM. Velocidad de aproximación: $20 \mu\text{m s}^{-1}$.

Tras realizar las curvas de aproximación, se representó la dependencia de las corrientes de reducción registradas en función de la concentración de SPY en las diferentes mezclas de competición. Para ello se tomó el valor de corriente catódica medido en las diferentes curvas de aproximación a una distancia de la superficie de $15 \mu\text{m}$, distancia a la cual se obtuvieron las máximas respuestas en las corrientes de reducción. Tras ajustar los datos obtenidos a la *Ecuación (1)*, se obtuvo la curva de calibrado que se muestra en la **Figura 4.72**.

La curva de calibrado obtenida ($r^2 = 0.999$) mostró el hábito esperado para un ensayo competitivo, presentando un ID comprendido entre (0.5 ± 0.2) y $(56 \pm 8) \text{ ng mL}^{-1}$, con un IC_{50} de $(5.4 \pm 0.9) \text{ ng mL}^{-1}$ y un LD de $(0.13 \pm 0.05) \text{ ng mL}^{-1}$. Se calculó también la desviación estándar relativa de las respuestas amperométricas obtenidas con este sistema de detección para los valores de corriente catódica medidos en las curvas de aproximación registradas sobre regiones de diferentes inmunoplateformas, incubadas con disoluciones de leche:PBST (1:1), conteniendo sólo el trazador enzimático (en ausencia de SPY libre). La RSD obtenida ($n=3$) fue del 2.4 %, confirmando que es posible obtener respuestas reproducibles con diferentes placas de carbono vitrificado modificadas de la misma manera.

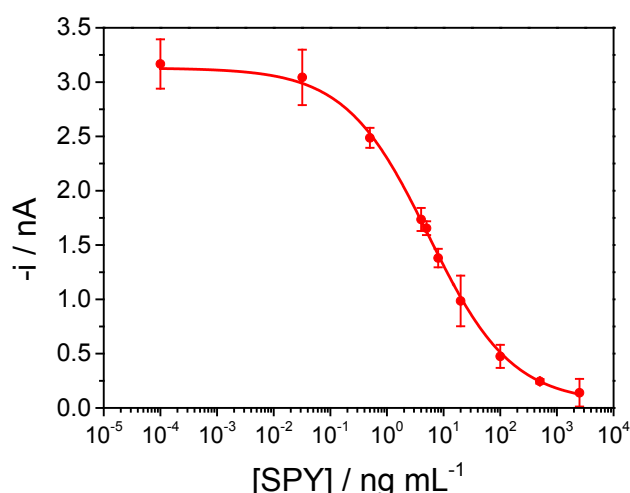


Figura 4.72. Curva de calibrado obtenida al representar las intensidades de corriente catódica máximas correspondientes a las diferentes curvas de aproximación registradas, en función de la concentración de SPY en las mezclas de competición en leche:PBST (1:1) con las que se incubó la inmunoplateforma. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$).

Barrido superficial de las superficies modificadas

Se realizó un barrido superficial con objeto de visualizar las variaciones en las respuestas amperométricas obtenidas sobre regiones de diferente actividad enzimática, como resultado de las diferentes concentraciones de SPY en las disoluciones de competición con las que se incubó la inmunoplateforma. Este análisis superficial se realizó barriendo el microelectrodo de fibra de carbono a lo largo de la superficie mientras se aplicaba un potencial de -400 mV (vs. Ag/AgCl) para la reducción de la BQ generada enzimáticamente. Los barridos se realizaron posicionando el UME a una distancia constante a la superficie de $15\text{ }\mu\text{m}$, distancia a la cual se obtuvieron las máximas respuestas amperométricas en las curvas de aproximación registradas previamente. La imagen superficial obtenida por SECM para cuatro regiones de la placa incubadas con diferentes mezclas de competición se presenta en la **Figura 4.73**.

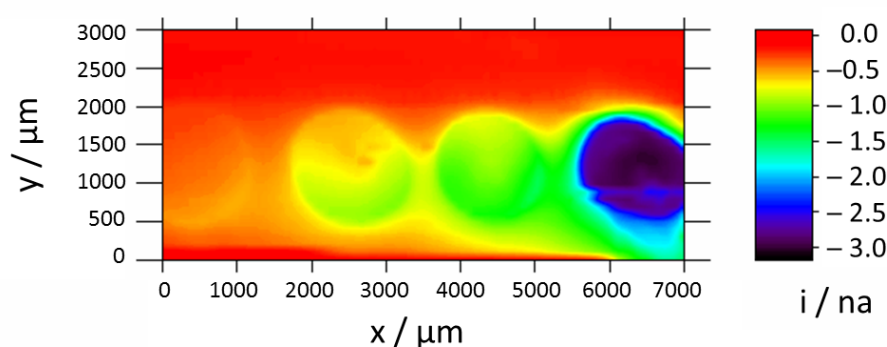


Figura 4.73. Barrido superficial por SECM para cuatro regiones de la inmunoplateforma incubadas con diferentes mezclas de competición SPY/SPY-HRP. De izquierda a derecha: 2500, 20, 5 y 0 ng mL⁻¹ de SPY. Velocidad de barrido: $100\text{ }\mu\text{m s}^{-1}$. $E_{\text{UME}} = -400$ mV (vs. Ag/AgCl). Medio: disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 6.0) conteniendo HQ 1 mM y H₂O₂ 1 mM. Distancia entre el microelectrodo y la superficie: $15\text{ }\mu\text{m}$.

Las regiones circulares observadas se atribuyeron a la reducción de la BQ generada en la reacción catalizada por la HRP. Las intensidades de corriente registradas permitieron diferenciar

claramente entre regiones incubadas con las diferentes disoluciones de competición, registrándose mayores corrientes catódicas para menores concentraciones de SPY en dichas mezclas. La imagen superficial por SECM se obtuvo barriendo el microelectrodo una determinada distancia a lo largo de la dirección x ; una vez alcanzada esta distancia final, el microelectrodo volvió a la posición inicial, se desplazó en la dirección y , y se realizó un nuevo barrido, repitiéndose el proceso hasta cubrir el área deseada. La **Figura 4.74** muestra la superposición en dos dimensiones de la intensidad de corriente registrada con el UME en todos los barridos lineales realizados en el eje x , separados por una distancia de $100\ \mu\text{m}$ en la dirección y . La intensidad de corriente catódica máxima registrada para cada una de las regiones modificadas se corresponde con la intensidad de corriente registrada en las curvas de aproximación hacia la superficie analizada, sugiriendo la posibilidad del análisis y cuantificación de regiones de la inmunoplateforma incubadas con diferentes mezclas de competición a través de un barrido lineal a lo largo de las mismas.

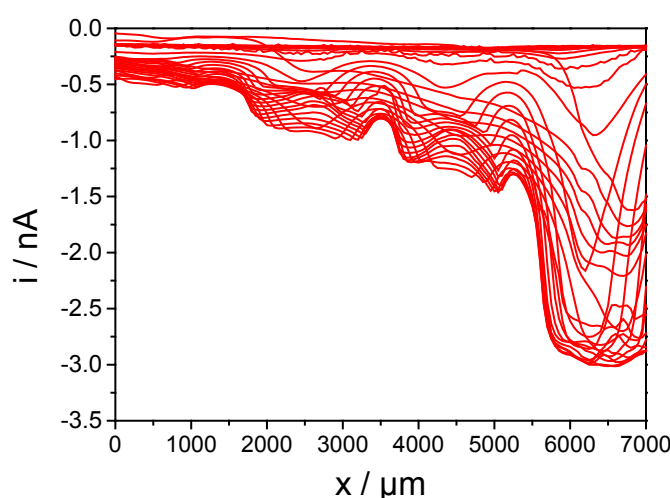


Figura 4.74. Superposición de los barridos realizados en SECM a lo largo del eje x , en la obtención de la imagen superficial representada en la **Figura 4.73**, para cuatro regiones de la inmunoplateforma incubadas con diferentes mezclas de competición SPY/SPY-HRP. De izquierda a derecha: 2500 , 20 , 5 y $0\ \text{ng mL}^{-1}$ de SPY.

4.4.1.3 Modo competitivo: Deposición enzimática de nanopartículas de plata

Las inmunoplateformas se interrogaron también utilizando un modo competitivo de la SECM. Para ello, una vez realizado el inmunoensayo competitivo se llevó a cabo la deposición catalizada enzimáticamente de nanopartículas de plata (nAg) y se estudiaron las superficies modificadas empleando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ como sonda redox. Utilizando un bipotenciostato, se aplicaron potenciales constantes tanto a la placa de carbono vitrificado como al UME de fibra de carbono, estableciéndose así una competición entre ambos por el consumo de ferrocianuro, con lo que se consiguió una elevada resolución en la visualización de las regiones modificadas con nAg depositadas.

Una vez realizado el ensayo competitivo, se llevó a cabo la deposición de nAg según el protocolo descrito en el *Apartado 3.4.15*. Como se muestra en la **Figura 4.75**, debido a que la formación de nAg está catalizada por la enzima HRP, la deposición de estas nanopartículas se produjo en las inmediaciones del trazador enzimático SPY-HRP capturado por los anticuerpos

inmovilizados, obteniéndose por tanto una mayor cantidad de nAg depositadas cuanto menor era la concentración de SPY en la mezcla de competición SPY/SPY-HRP con la que se incubó la inmunoplateforma.

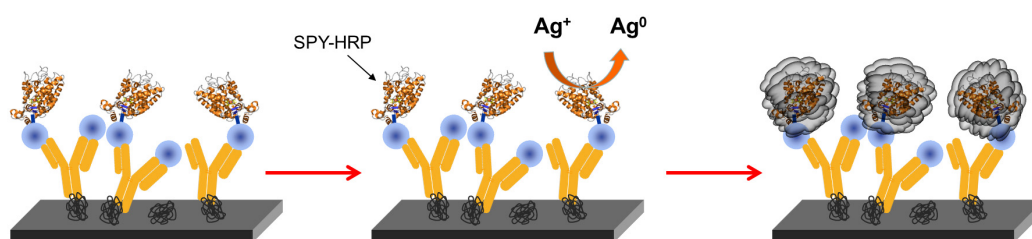


Figura 4.75. Representación esquemática de la deposición de nAg catalizada por la enzima HRP, tras realizar el inmunoensayo competitivo, durante la incubación con una alícuota de disolución reguladora de citrato (pH 4.0) conteniendo HQ 2.5 mg mL⁻¹, AgNO₃ 1.0 mg mL⁻¹ y H₂O₂ 0.06 % (p/v).

Curvas de aproximación en dirección z hacia las superficies modificadas

Se registraron curvas de aproximación en el modo *feedback* de la SECM, empleando $[Fe(CN)_6]^{4-}$ como sonda redox. Para la aproximación inicial a las superficies modificadas, el microelectrodo se polarizó a 600 mV (vs. Ag/AgCl), potencial suficientemente positivo para la oxidación de $[Fe(CN)_6]^{4-}$, y se posicionó sobre una región de la inmunoplateforma no incubada previamente con SPY o SPY-HRP y por tanto en ausencia de nAg depositadas. Esta aproximación se realizó manteniendo la placa de carbono a su potencial de circuito abierto (OCP, ~130 mV vs. Ag/AgCl). A continuación se registraron diferentes curvas de aproximación hacia la superficie interrogada con el UME situado sobre la misma región de la inmunoplateforma y polarizando ésta a diferentes potenciales: 0, 300 y 350 mV (vs. Ag/AgCl). Las curvas de aproximación normalizadas obtenidas se muestran en la **Figura 4.76a**.

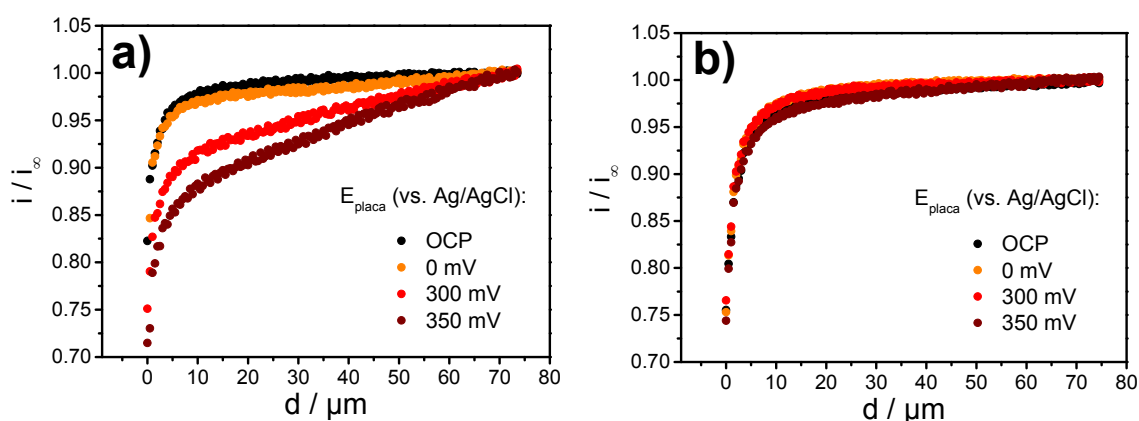


Figura 4.76. Curvas de aproximación en dirección z hacia las superficies interrogadas registradas mediante la aplicación de diferentes potenciales a la placa de carbono vitrificado y con el UME de fibra de carbono posicionado: **a)** sobre una región de la inmunoplateforma sin nAg depositadas, **b)** sobre una región con nAg depositadas. Medio: $[Fe(CN)_6]^{4-}$ 5.0 mM conteniendo KCl 100 mM. E_{UME} = 600 mV (vs. Ag/AgCl). Velocidad de aproximación: 5 $\mu m s^{-1}$.

Como se puede observar, al aproximar el UME a la inmunoplateforma, la corriente normalizada disminuyó independientemente de la diferencia de potencial aplicada a la misma, como resultado del impedimento en la difusión del mediador redox hacia el microelectrodo. Al aumentar el valor del potencial al que se polarizó la placa de carbono, el consumo de la especie $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (es decir la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+}) fue mayor, como resultado de su oxidación sobre la superficie de la inmunoplateforma, por lo que la corriente registrada en el microelectrodo disminuyó más rápidamente al aproximarse a la superficie analizada cuando las placas se polarizaron a mayores potenciales.

Por el contrario, como se observa en la **Figura 4.76b**, cuando se registraron curvas de aproximación sobre una región de la inmunoplateforma incubada previamente con una disolución de SPY-HRP y por tanto con nAg depositadas, la corriente registrada con el microelectrodo era independiente del potencial al que se polarizara la placa de carbono, indicando que la oxidación de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ no ocurre sobre las nanopartículas depositadas, independientemente de la diferencia de potencial aplicada a la inmunoplateforma, y por tanto demostrando que las nanopartículas no están conectadas a la superficie de carbono. Este diferente comportamiento electroquímico en las superficies interrogadas permitió la visualización de regiones de la inmunoplateforma con nAg depositadas.

Barrido superficial de las inmunoplateformas

Se obtuvieron imágenes superficiales por SECM de las inmunoplateformas barriendo el microelectrodo de fibra de carbono a lo largo de la superficie modificada manteniendo el mismo a un potencial de 600 mV (vs. Ag/AgCl) para la oxidación de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Estos barridos se realizaron a una distancia constante entre el UME y la superficie interrogada de 8 μm , distancia suficientemente pequeña para registrar los cambios en la corriente electródica registrada bajo el esquema *feedback* de la SECM.

La superficie se escaneó varias veces en un área de $2000 \times 2000 \mu\text{m}^2$, incluyendo una región circular de la inmunoplateforma, de aproximadamente 1 mm de diámetro, con nAg depositadas. El primer barrido se realizó sin polarizar la placa, a un OCP de ~ 130 mV (vs. Ag/AgCl). Como se observa en la **Figura 4.77a**, en estas condiciones no se observaron diferencias a lo largo de la superficie escaneada debidas a la presencia de nAg, apreciándose solamente variaciones de la corriente causadas por imperfecciones en la placa de carbono vitrificado. En el barrido realizado cuando la inmunoplateforma se polarizó a 0 mV, fue posible visualizar la región con nAg depositadas (**Figura 4.77b**). En este caso, debido a que el potencial aplicado es menor que el potencial formal de la sonda redox, se registró un típico barrido en el modo *feedback*, en el que el Fe^{3+} generado en la superficie del UME es reducido a Fe^{2+} sobre la placa de carbono, aumentando localmente la concentración de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ sobre la placa de carbono sin modificar y por tanto la corriente anódica registrada con el UME.

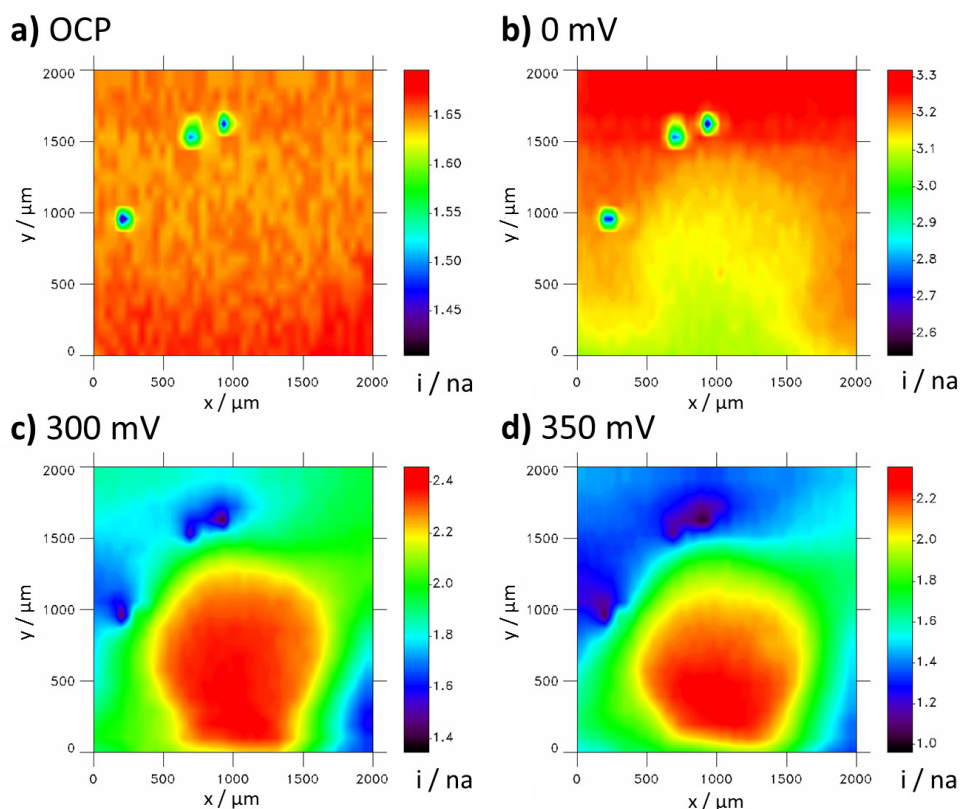


Figura 4.77. Barridos superficiales por SECM de una región circular con nAg depositadas enzimáticamente sobre la inmunoplateforma previamente incubada con una disolución de SPY-HRP. Los barridos se realizaron con la placa: **a)** a su OCP; o polarizada a: **b)** 0 mV; **c)** 300 mV; **d)** 350 mV (vs. Ag/AgCl). $E_{UME} = 600$ mV (vs. Ag/AgCl). Medio: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5.0 mM + KCl 100 mM. Velocidad de barrido: $100 \mu\text{m s}^{-1}$. Distancia entre la superficie y el microelectrodo: $8 \mu\text{m}$.

Un mayor contraste en la visualización de la región de la inmunoplateforma con nAg depositadas se obtuvo polarizando la placa de carbono a potenciales elevados. Como se observa en las **Figuras 4.77c y d**, cuando la inmunoplateforma se polarizó a potenciales anódicos suficientemente altos (300 ó 350 mV vs. Ag/AgCl), la propia superficie de carbono compitió con el UME por la oxidación del mediador redox en disolución, disminuyendo la concentración local de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ y por tanto la corriente registrada con el UME. Debido a que como se ha comentado anteriormente, no se produce oxidación de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ sobre las nAg depositadas, las corrientes registradas con el UME sobre estas regiones fueron mayores, permitiendo así una clara visualización de la región de la inmunoplateforma con nAg depositadas.

Con objeto de verificar el comportamiento descrito, las placas de carbono modificadas se escanearon con el UME de fibra de carbono polarizado a 0 mV (vs. Ag/AgCl), un potencial aplicado no adecuado para la oxidación de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Según se observa en la **Figura 4.78a** de nuevo con la superficie de carbono a su OCP no fue posible la visualización de nAg depositadas. Cuando la inmunoplateforma se polarizó a 0 mV (vs. Ag/AgCl), tampoco se observó prácticamente una visualización clara de las nanopartículas ya que el potencial no fue suficiente como para oxidar el Fe^{2+} .

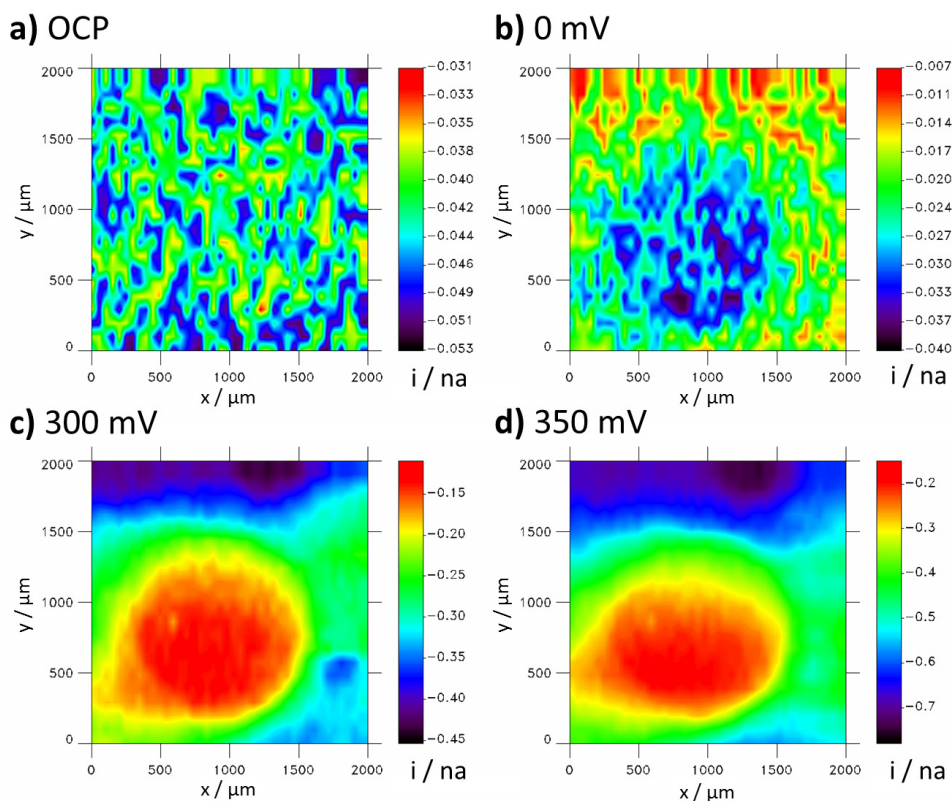


Figura 4.78. Barridos superficiales por SECM de una región con nAg depositadas enzimáticamente sobre la inmunoplateforma previamente incubada con una disolución de SPY-HRP. Los barridos se realizaron con la placa: **a)** a su OCP; o polarizada a: **b)** 0 mV; **c)** 300 mV; **d)** 350 mV (vs. Ag/AgCl). $E_{UME} = 0$ mV (vs. Ag/AgCl). Medio: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5.0 mM + KCl 100 mM. Velocidad de barrido: $100 \mu\text{m s}^{-1}$. Distancia entre la superficie y el microelectrodo: $8 \mu\text{m}$.

Cuando la inmunoplateforma se polarizó a potenciales elevados se registró un barrido en el modo *feedback*, en el que la sonda redox se oxidó en la superficie de la placa de carbono, generando Fe^{3+} que fue reducido por el UME al potencial aplicado, por lo que la intensidad de corriente catódica registrada con el mismo fue mayor. Debido a que no se produjo oxidación de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ sobre las nAg depositadas, la corriente catódica registrada con el UME fue menor sobre esta región, lo que permitió nuevamente la visualización de nAg depositadas sobre la inmunoplateforma (**Figuras 4.78c y d**).

Finalmente, se realizó también un barrido por SECM en el modo de competición redox, polarizando el UME a 600 mV y la placa de carbono a 300 mV, para obtener la imagen superficial de tres regiones de la inmunoplateforma previamente incubadas con disoluciones de competición SPY/SPY-HRP con diferentes concentraciones de SPY. Como se observa en la **Figura 4.79**, las intensidades de corriente registradas permitieron distinguir claramente entre regiones de la inmunoplateforma incubadas con disoluciones de diferentes concentraciones de SPY, obteniéndose mayores intensidades de corriente anódica para menores concentraciones de SPY en la mezcla de competición. Esto indicó la presencia del trazador enzimático de acuerdo al inmunoensayo competitivo propuesto y la deposición localizada de nAg catalizada enzimáticamente.

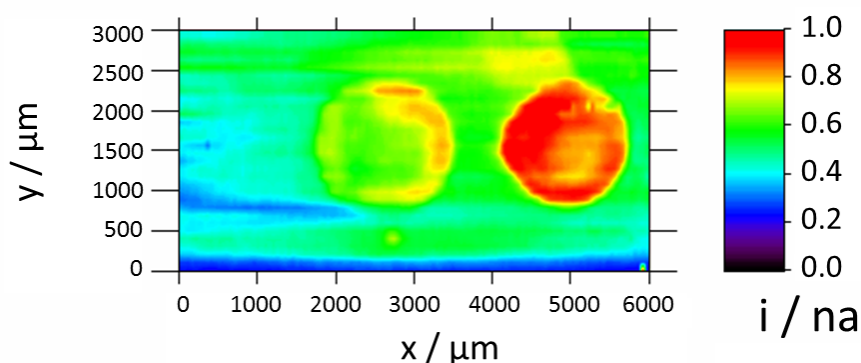


Figura 4.79. Barrido superficial por SECM de tres regiones con nAg depositadas enzimáticamente sobre una inmunoplateforma previamente incubada con disoluciones de competición SPY/SPY-HRP en leche:PBST (1:1), con concentraciones de SPY variables, de izquierda a derecha: 2500, 5 y 0 ng mL⁻¹ SPY. Velocidad de barrido: 100 μm s⁻¹. E_{UME} = 600 mV; E_{placa} = 300 mV (ambos vs. Ag/AgCl). Medio: [Fe(CN)₆]⁴⁻ 5.0 mM + KCl 100 mM. Distancia entre la superficie analizada y el microelectrodo: 8 μm.

4.4.1.4 Conclusiones

Se ha demostrado que la interrogación de inmunoplateformas utilizando el modo G/C de la SECM permite llevar a cabo un análisis cuantitativo de residuos de sulfonamidas en leche. El ensayo propuesto presentó un excelente funcionamiento analítico en términos de sensibilidad, con un LD de 0.13 ng mL⁻¹, considerablemente inferior al LMR establecido para el antibiótico ensayado. La excelente reproducibilidad del ensayo, así como la posibilidad de realizar medidas mediante barridos lineales, ponen de manifiesto la utilidad de la SECM como herramienta analítica eficiente para la cuantificación de analitos de bajo peso molecular, como son las sulfonamidas.

Por otro lado, la competición entre el UME y la superficie de carbono analizada por la oxidación de la sonda redox [Fe(CN)₆]⁴⁻ en un modo competitivo de la SECM, permitió obtener un elevado contraste en la visualización de nAg depositadas enzimáticamente tras realizar el inmunoensayo para la detección de SPY, demostrando la utilidad de esta estrategia para el análisis de superficies biosensoras amplificadas mediante la deposición catalizada enzimáticamente de nAg.

4.4.2 Célula de biocombustible (BFC)

Se ha utilizado un prototipo de BFC como un novedoso sistema analítico que permite también la determinación de residuos de sulfonamidas en leche. La BFC se construyó empleando un bioánodo que incorpora la enzima celobiosa deshidrogenasa (CDH) coimmobilizada con azul de toluidina para la oxidación biocatalítica de la lactosa de la leche a ácido lactobiónico. Como biocátodo se empleó un inmunosensor para sulfonamidas que permitió la cuantificación de residuos de antibióticos a través de la reducción de H_2O_2 mediada por ABTS, tras realizar un inmunoensayo competitivo en presencia de un análogo de antibiótico marcado con HRP. El diseño que se ha realizado constituyó el primer ejemplo de una BFC bajo control inmunológico para la determinación de residuos de antibióticos.

4.4.2.1 Inmunosensor empleado como biocátodo

El inmunosensor empleado como biocátodo (**Figura 4.80**) se fabricó modificando electrodos de barra de grafito (\varnothing 3 mm) con radicales amino del 4-ABA para la unión covalente de proteína G y la posterior inmovilización orientada de antiSPY. La fabricación de este inmunosensor se basó en el inmunosensor integrado desarrollado para la determinación de sulfonamidas (*Apartado 4.2.1*) incorporando también la proteína G para conseguir la inmovilización orientada de los anticuerpos, como se hizo con las inmunoplateformas preparadas en los análisis por SECM.

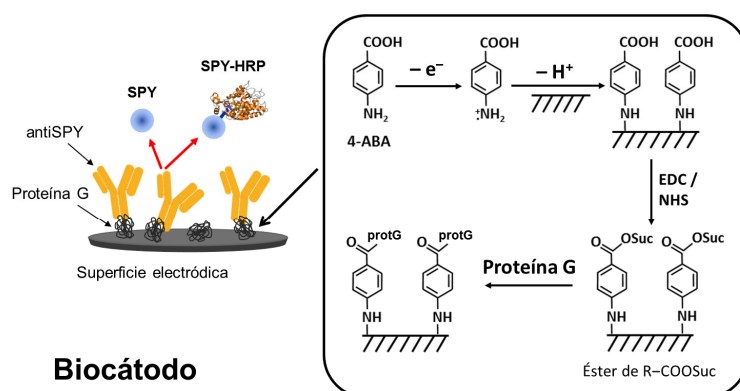
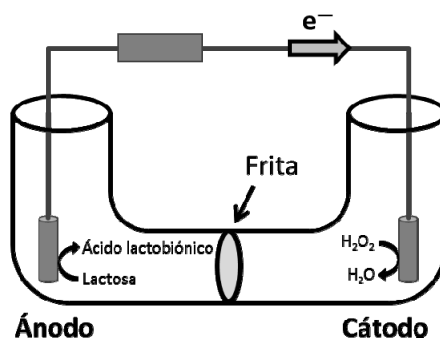


Figura 4.80. Detalles del inmunosensor preparado para la determinación de residuos de sulfonamidas empleado como biocátodo en una BFC. En el recuadro se muestra la química superficial implicada en la modificación de los electrodos de grafito.

Una vez fabricado, el inmunosensor se incubó en una disolución de leche diluida 1:1 con PBST incorporando una concentración establecida del trazador enzimático, estableciéndose una competición entre la sulfonamida en la muestra de leche y el análogo de antibiótico marcado con HRP por los sitios de unión de los anticuerpos inmovilizados. Tras esta etapa de incubación, el electrodo se lavó con PBST y se empleó como biocátodo en el prototipo de BFC diseñado. De este modo se obtuvieron diferentes biocátodos, correspondientes a las diferentes disoluciones de leche analizadas, que permitieron evaluar el contenido de sulfonamidas en las mismas a partir de la densidad de potencia derivada de la BFC.

4.4.2.2 Construcción del prototipo de BFC

El prototipo de BFC se representa en el **Esquema 4.6** y consistió en un sistema de células independientes incorporando un biocátodo constituido por el inmunosensor previamente descrito y un bioánodo formado por un electrodo de grafito modificado con CDH, un agente entrecruzante y el polímero redox P017-TB que incorpora azul de toluidina como mediador de la transferencia electrónica entre la superficie electródica y la enzima. La enzima CDH inmovilizada en el bioánodo es capaz de oxidar la lactosa presente en la leche a ácido lactobiónico [Maischberger, 2008], empleando así este sustrato como combustible en la BFC.



Esquema 4.6. Representación esquemática del prototipo de célula de biocombustible construida.

La **Figura 4.81a** muestra un considerable aumento de la corriente catalítica registrada con el bioelectrodo empleado como ánodo tras la adición de lactosa 140 mM (contenido medio de lactosa en leche [Conzuelo, 2010]), indicando la oxidación de la misma a ácido lactobiónico.

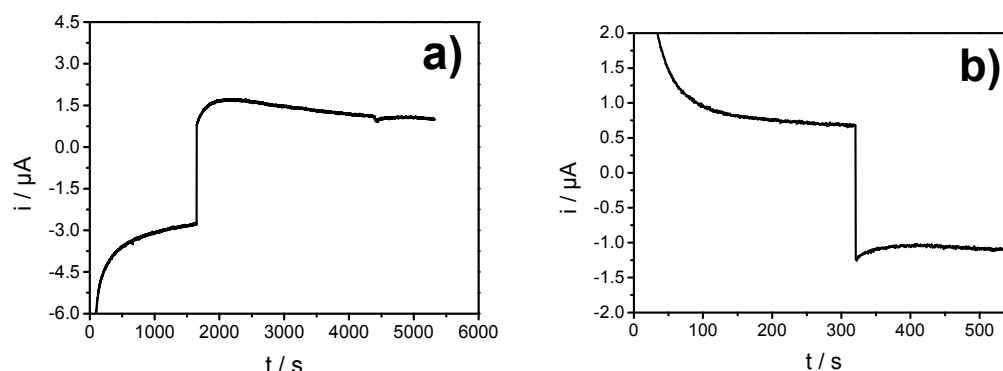


Figura 4.81. Señales cronoamperométricas registradas con los bioelectrodos empleados en la construcción del prototipo de BFC: **a)** bioánodo tras la adición de lactosa 140 mM. Medio: disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0). $E_{ap} = -150$ mV (vs. Ag/AgCl); **b)** biocátodo preparado en ausencia de SPY libre, tras la adición de H_2O_2 1.0 mM. Medio: ABTS 0.25 mM en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 7.0). $E_{ap} = 400$ mV (vs. Ag/AgCl).

Por otro lado, empleando un biocátodo obtenido tras la incubación del inmunosensor descrito anteriormente en una disolución de leche conteniendo SPY-HRP y en ausencia de SPY, se registró la respuesta cronoamperométrica tras la adición de H_2O_2 1.0 mM, en presencia de ABTS 0.25 mM como mediador redox, que se muestra en la **Figura 4.81b**. La notable disminución de la corriente registrada fue debida a la reducción del sustrato enzimático en presencia de ABTS y catalizada por la HRP inmovilizada sobre la superficie del electrodo.

La **Figura 4.82a** ilustra el funcionamiento de la BFC bajo control inmunológico. La lactosa en la leche proporciona el combustible del bioánodo, en el que se oxida a ácido lactobiónico y

los electrones liberados fluyen al biocátodo. En este bioelectrodo, el trazador enzimático capturado por los anticuerpos inmovilizados permite la reducción de H_2O_2 por la HRP, produciendo un trabajo eléctrico en la BFC. Como se representa en la **Figura 4.82b**, si la concentración de antibiótico en la muestra analizada es suficientemente elevada, éste desplazará al trazador enzimático durante el ensayo competitivo, impidiendo el enlace de SPY-HRP por los anticuerpos y no pudiéndose así llevar a cabo la reducción del H_2O_2 , por lo que la BFC no será capaz de generar trabajo eléctrico. La potencia generada por la BFC será por tanto inversamente proporcional a la concentración de antibiótico en la muestra analizada permitiendo la cuantificación del analito.

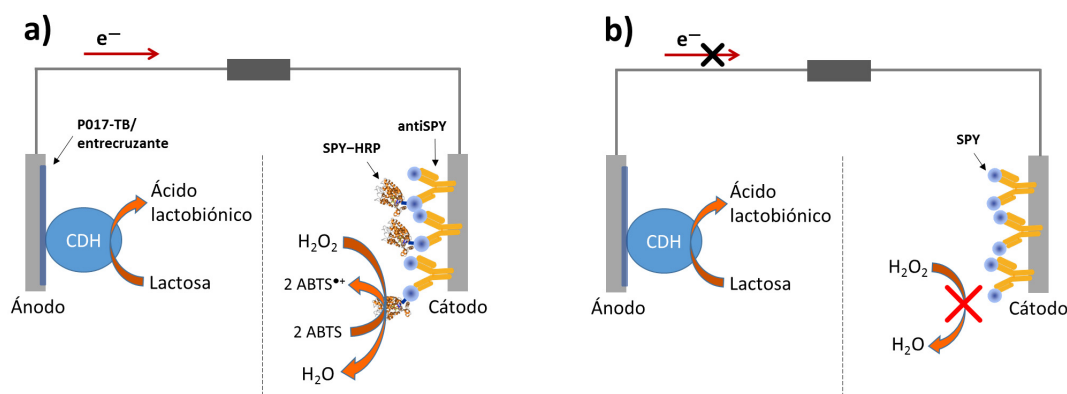


Figura 4.82. Representación de la BFC diseñada que permite la determinación de residuos de sulfonamidas en leche mediante control inmunológico. **a)** El trazador enzimático SPY-HRP es capturado por los anticuerpos inmovilizados permitiendo el flujo de la corriente a través de la reducción de H_2O_2 . **b)** Si la concentración de antibiótico en la muestra analizada es suficientemente elevada, el trazador enzimático es desplazado de los anticuerpos inmovilizados durante la etapa de competición y por tanto no es posible el flujo de corriente en la BFC.

4.4.2.3 Funcionamiento de la BFC

El funcionamiento de la BFC desarrollada se evaluó preparando diferentes biocátodos, incubando cada uno con disoluciones de leche conteniendo diferentes concentraciones de SPY tras su dilución 1:1 con PBST conteniendo la cantidad optimizada de trazador enzimático. A modo de ejemplo en la **Figura 4.83** se muestran las curvas de potencia obtenidas para BFCs construidas con tres biocátodos obtenidos tras incubar los inmunosensores en disoluciones de SPY 0, 12.5 y 5000 ng mL^{-1} . A bajos voltajes de célula se observó una respuesta independiente de la concentración de SPY, que por tanto no puede ser atribuida al proceso catalizado enzimáticamente. Por el contrario, a elevados voltajes la variación de la densidad de potencia en función del voltaje de la célula presentó una respuesta típica en forma de campana, con un máximo de densidad de potencia dependiente de la concentración de antibiótico y que permitió emplear este sistema como dispositivo biosensor.

El voltaje a circuito abierto (OCV) obtenido para la BFC con un biocátodo preparado en ausencia de SPY libre fue de 676 mV, correspondiente a la diferencia entre los OCPs individuales del bioánodo y el biocátodo. En la configuración empleada se obtuvo una densidad de potencia máxima de aproximadamente $6.9 \mu\text{W cm}^{-2}$ a 550 mV. Para el biocátodo preparado con 5000 ng mL^{-1} de SPY no se obtuvo respuesta apreciable alguna para voltajes en torno a 550 mV, en cambio, para el biocátodo preparado con 12.5 ng mL^{-1} de SPY, la variación de la densidad de corriente presentó un máximo a 550 mV que fue menor que el obtenido con el biocátodo

preparado en ausencia de SPY libre. De acuerdo con estos resultados, la densidad de potencia máxima obtenida fue inversamente proporcional a la concentración de SPY en la disolución de leche analizada, por lo que, tras la incubación de diferentes inmunosensores en disoluciones de leche y su empleo como biocátodos en la configuración descrita, la potencia de salida de la BFC puede ser usada para la cuantificación de residuos de antibióticos.

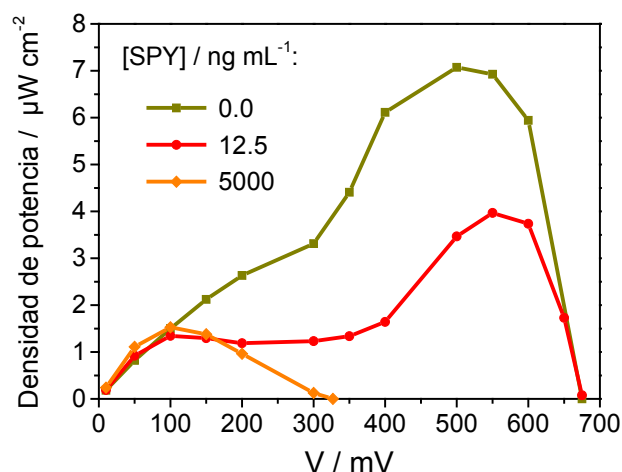


Figura 4.83. Dependencia de la densidad de potencia con el voltaje de la BFC, obtenida para tres biocátodos diferentes preparados tras la incubación de los inmunosensores en disoluciones de leche en presencia de 0, 12.5 ó 5000 ng mL^{-1} de SPY.

4.4.2.4 Determinación de SPY

A partir de los resultados descritos anteriormente, se construyó una curva de calibrado en la que se representó la densidad de potencia obtenida a 550 mV, en función de la concentración de SPY con la que se incubó el inmunosensor para la preparación del biocátodo (Figura 4.84).

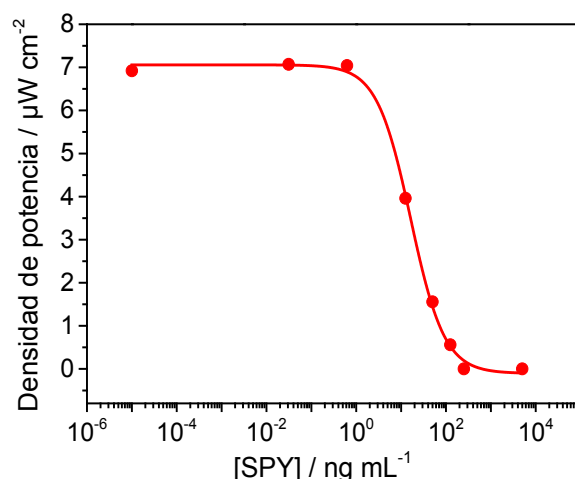


Figura 4.84. Curva de calibrado para SPY construida representando la densidad de potencia medida a 550 mV con BFCs fabricadas con diferentes biocátodos, en función de la concentración de SPY en las disoluciones de leche entera diluida 1:1 con PBST.

Se obtuvo una densidad de potencia máxima estable de aproximadamente $7 \mu\text{W cm}^{-2}$ para concentraciones de SPY inferiores a 0.625 ng mL^{-1} , mientras que para mayores concentraciones de SPY se observó una disminución acusada de potencia y no se obtuvo trabajo eléctrico para concentraciones de SPY superiores a 250 ng mL^{-1} . Con los resultados obtenidos se construyó una curva de calibrado para SPY ($r^2 = 0.998$) que presentó un ID comprendido entre (5 ± 2) y $(55 \pm 18) \text{ ng mL}^{-1}$, con un IC_{50} de $(16 \pm 3) \text{ ng mL}^{-1}$ y un LD de $(2.4 \pm 0.5) \text{ ng mL}^{-1}$.

4.4.2.5 Conclusiones

Los resultados presentados constituyen el primer ejemplo del diseño y fabricación de una BFC bajo control inmunológico que puede ser empleada para la determinación de residuos de antibióticos. El ensayo propuesto presentó excelentes características analíticas en términos de sensibilidad, con un LD para SPY más de 40 veces inferior al LMR establecido por la legislación Europea, cumpliendo así con la detectabilidad requerida para la determinación de residuos de sulfonamidas en leche, demostrando que el sistema desarrollado puede ser aplicado exitosamente con fines analíticos cuantitativos.

Parte II.

Estrategias desarrolladas para la
multidetección de residuos de diferentes
familias de antibióticos

4.5 Inmunosensor integrado dual para la determinación simultánea de sulfonamidas y tetraciclinas

Se ha desarrollado un inmunosensor amperométrico integrado dual para la determinación simultánea de residuos de antibióticos pertenecientes a las familias de las sulfonamidas y tetraciclinas en leche. Este inmunosensor está basado en la inmovilización de anticuerpos selectivos frente a cada una de las familias sobre la superficie de electrodos serigrافيados duales de carbono, previamente modificados con proteína G unida covalentemente sobre la superficie de los electrodos modificada con 4-ABA (ver **Figura 4.85**). La determinación se basa en un ensayo competitivo directo en el que los residuos de sulfonamidas y tetraciclinas presentes en la muestra compiten con una concentración fija de los trazadores enzimáticos (SPY-HRP y TC-HRP, respectivamente) por los limitados sitios de unión de los anticuerpos inmovilizados. La detección amperométrica se realizó empleando HQ como mediador redox y H_2O_2 como sustrato enzimático.

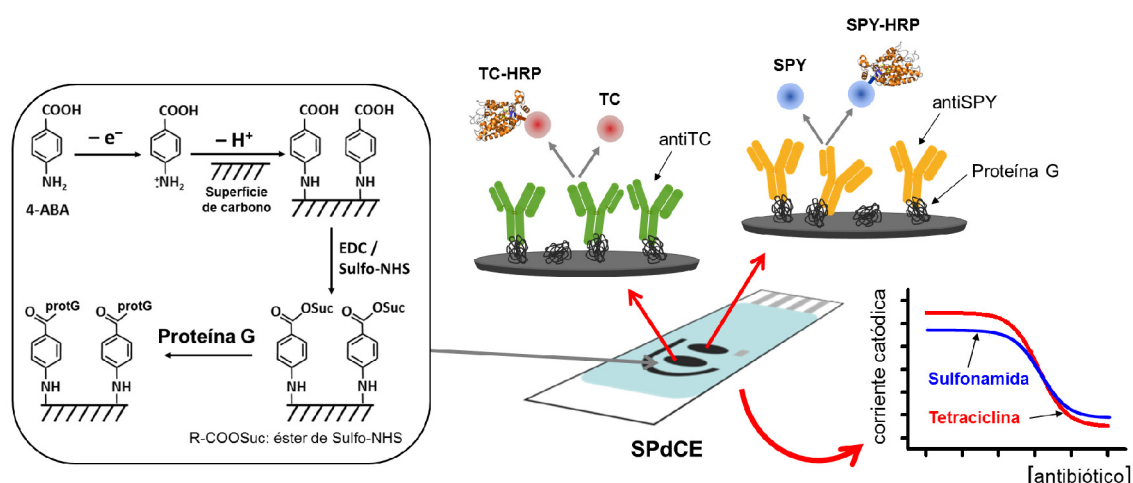


Figura 4.85. Representación esquemática del inmunosensor dual desarrollado para la determinación de sulfonamidas y tetraciclinas. Los anticuerpos de captura se inmovilizan de forma orientada sobre la superficie de los electrodos de trabajo modificados con proteína G. En el recuadro de la izquierda se detalla la química superficial para la inmovilización covalente de proteína G. Se establece una competición entre los residuos de antibióticos de la muestra y los trazadores enzimáticos por los limitados sitios de unión de los anticuerpos inmovilizados.

4.5.1 Optimización de las variables experimentales

Para desarrollar este trabajo, se utilizaron algunos de los parámetros experimentales previamente optimizados en el *Apartado 4.2.1* para el inmunosensor integrado para la determinación de sulfonamidas. Además, se evaluaron todas aquellas nuevas variables implicadas en la preparación del inmunosensor dual con objeto de obtener un sistema sensor que permitiera la determinación fiable, sensible y selectiva de residuos de sulfonamidas y tetraciclinas en muestras de leche en el menor tiempo de análisis.

Inmovilización orientada de los anticuerpos

Puesto que como se ha comentado previamente, las proteínas bacterianas A y G presentan diferentes afinidades en función del origen y naturaleza de las inmunoglobulinas (ver *Apartado 2.4.1*), se evaluó el efecto que el empleo de ambas pudiera tener en la preparación del inmunosensor dual. En la **Figura 4.86** se comparan las señales amperométricas obtenidas para inmunosensores fabricados en ausencia o en presencia de cada una de las proteínas bacterianas.

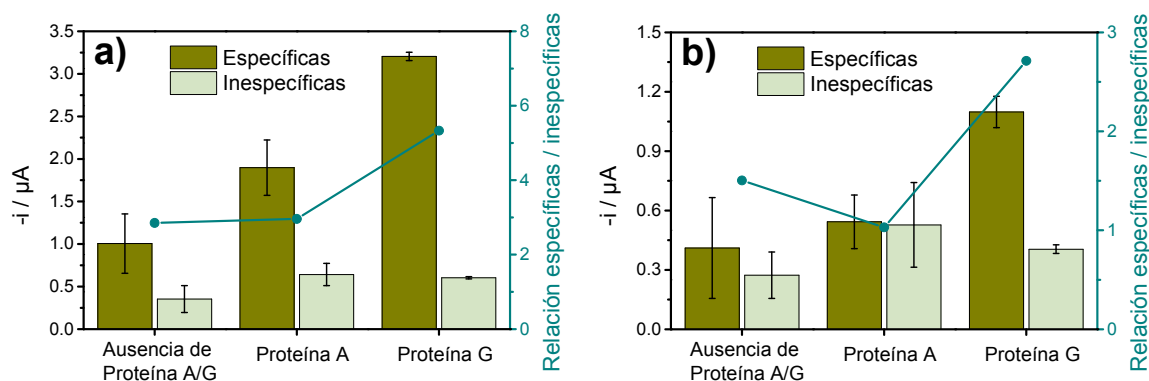


Figura 4.86. Comparación de las señales amperométricas obtenidas a -200 mV (vs. Ag) para inmunosensores preparados inmovilizando los anticuerpos: **a)** antiSPY o **b)** antiTC, en ausencia o en presencia de cada una de las proteínas bacterianas estudiadas. Las señales específicas corresponden a las obtenidas inmovilizando anticuerpo de captura, mientras que las inespecíficas corresponden a las obtenidas en ausencia de anticuerpo de captura inmovilizado, tras la incubación del sensor en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con PBST y conteniendo: **a)** SPY-HRP o **b)** TC-HRP. $[ProtA] = [ProtG] = 20 \mu g mL^{-1}$. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones obtenidas entre las señales específicas e inespecíficas, para cada caso.

Como se puede observar, la inmovilización de los anticuerpos de captura a través de estas proteínas bacterianas produce un considerable incremento en las señales específicas obtenidas. Sin embargo, la relación entre las señales específicas y las inespecíficas fue notablemente mayor cuando se trabajó con proteína G. Además, es importante destacar que se obtuvo una respuesta amperométrica aproximadamente 50 % superior cuando la proteína bacteriana se unió de forma covalente a la superficie del electrodo en comparación con la obtenida por simple adsorción de la misma. A la vista de estos resultados se decidió seguir trabajando con el inmunosensor dual preparado por inmovilización de los anticuerpos de captura sobre proteína G previamente inmovilizada covalentemente sobre los electrodos modificados con 4-ABA.

Proteína G para la inmovilización de los anticuerpos

Se optimizó la concentración de proteína G con la que se modificaron los electrodos de trabajo del electrodo serigrafiado dual, así como el tiempo de incubación para conseguir dicha inmovilización. Este estudio se realizó midiendo la corriente obtenida con diferentes inmunosensores duales incubando las superficies electródicas modificadas durante 30 min en disoluciones de proteína G con concentraciones comprendidas entre 10 y 50 $\mu g mL^{-1}$. Como se observa en la **Figura 4.87a**, las mayores respuestas amperométricas se obtuvieron trabajando con una concentración de proteína bacteriana de 10 $\mu g mL^{-1}$, disminuyendo para concentraciones superiores lo que probablemente es debido a una saturación de la superficie

electrónica con la biomolécula que dificulta la inmovilización eficiente posterior de los anticuerpos. Se optimizó también el tiempo de incubación de la proteína G sobre la superficie electrónica, variándolo entre 10 y 90 min. Como se observa en la **Figura 4.87b** un tiempo de incubación de 20 min fue suficiente para la adecuada inmovilización de la proteína G.

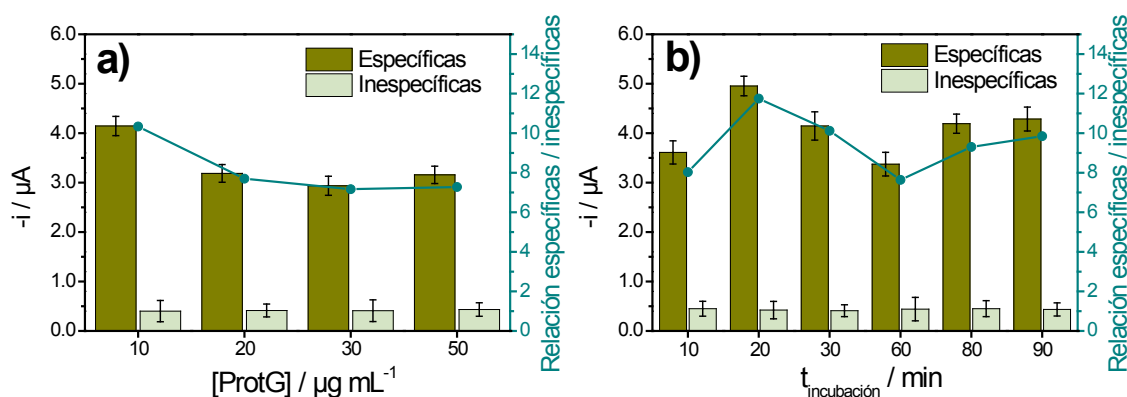


Figura 4.87. Optimización de la cantidad de ProtG para la inmovilización de anticuerpos: **a)** concentración de la disolución de ProtG, **b)** tiempo de incubación para la unión covalente de ProtG. Las señales específicas corresponden a las obtenidas inmovilizando antiSPY, mientras que las inespecíficas corresponden a las obtenidas en ausencia de anticuerpo inmovilizado, tras la incubación del sensor en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con PBST, conteniendo SPY-HRP. $E_{ap} = -200 \text{ mV}$ (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones obtenidas entre las señales específicas e inespecíficas, para cada caso.

Anticuerpos frente a sulfonamidas y tetraciclinas

Se evaluó también el efecto del tiempo de incubación y la concentración de las disoluciones de los anticuerpos empleados en la preparación del inmunosensor dual. El tiempo de incubación se optimizó entre 30 y 120 minutos con disoluciones de antiSPY de $300 \mu g \text{ mL}^{-1}$, resultando las mayores respuestas amperométricas para un tiempo de 90 min (**Figura 4.88**).

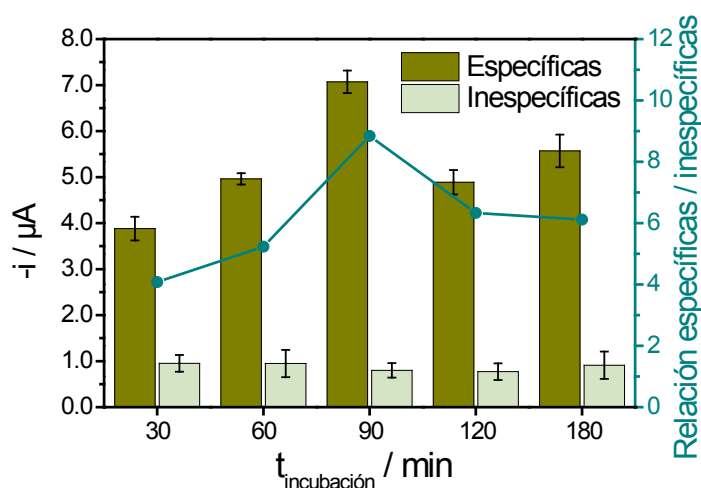


Figura 4.88. Optimización del tiempo de incubación para la inmovilización de anticuerpos. Las señales específicas corresponden a las obtenidas inmovilizando antiSPY, mientras que las inespecíficas corresponden a las obtenidas en ausencia de anticuerpo inmovilizado, tras la incubación del sensor en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con PBST, conteniendo SPY-HRP. $E_{ap} = -200 \text{ mV}$ (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones obtenidas entre las señales específicas e inespecíficas, para cada caso.

Las concentraciones de antiSPY y antiTC se variaron entre 200 y 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Mientras que para antiSPY la relación entre señales específicas e inespecíficas aumentó hasta 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (**Figura 4.89a**), para antiTC dicha relación aumentó hasta 285 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (**Figura 4.89b**) disminuyendo ligeramente para mayores concentraciones de anticuerpo inmovilizado, por lo que se seleccionaron los valores mencionados para experimentos posteriores.

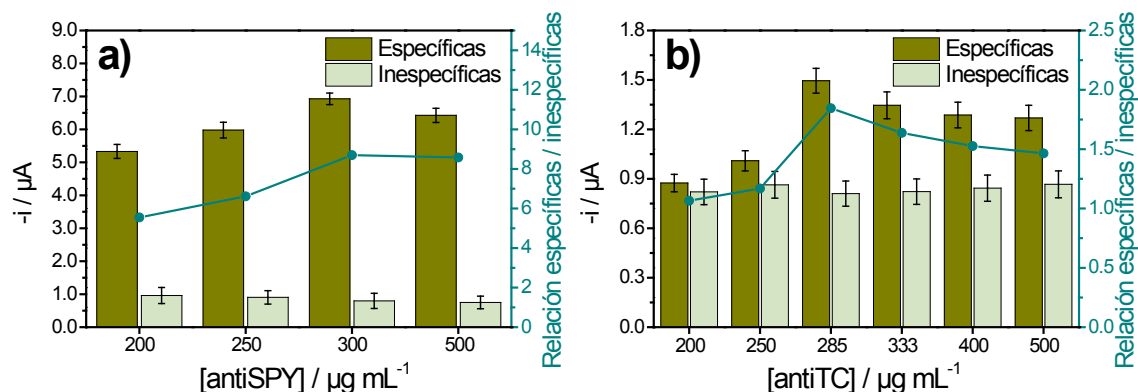


Figura 4.89. Optimización de la cantidad de anticuerpo inmovilizado: **a)** antiSPY, **b)** antiTC. Las señales específicas corresponden a las obtenidas inmovilizando anticuerpo, mientras que las inespecíficas corresponden a las medidas en ausencia de anticuerpo inmovilizado, tras la incubación del sensor en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con PBST, conteniendo: **a)** SPY-HRP (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) o **b)** TC-HRP (dil. 1/50). $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones obtenidas entre las señales específicas e inespecíficas, para cada caso.

Trazadores enzimáticos para el ensayo competitivo

Se optimizó también la concentración de los dos trazadores enzimáticos empleados en el inmunoensayo competitivo. La concentración de SPY-HRP se varió entre 0.5 y 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obteniéndose una mayor relación entre señales específicas e inespecíficas para 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (**Figura 4.90a**). Para TC-HRP, se varió la concentración empleando disoluciones del trazador enzimático comercial (de concentración no proporcionada) diluidas entre 1/50 y 1/200. Como se aprecia en la **Figura 4.90b**, la mayor relación entre señales específicas e inespecíficas se obtuvo en este caso con una dilución 1/50.

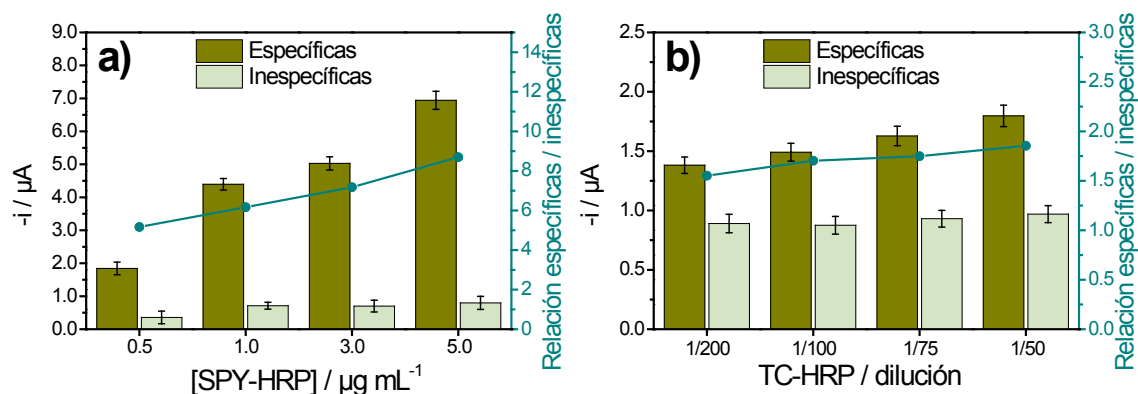


Figura 4.90. Optimización de la cantidad de trazadores enzimáticos empleados en el inmunoensayo: **a)** SPY-HRP, **b)** TC-HRP. Las señales específicas corresponden a las obtenidas inmovilizando anticuerpo, mientras que las inespecíficas corresponden a las obtenidas en ausencia de anticuerpo inmovilizado, tras la incubación del sensor en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con PBST, conteniendo: **a)** SPY-HRP o **b)** TC-HRP. $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestran también las relaciones obtenidas entre las señales específicas e inespecíficas, para cada caso.

4.5.2 Selectividad del inmunosensor dual

Con objeto de evaluar la viabilidad del inmunosensor dual para la determinación simultánea de sulfonamidas y tetraciclinas, se estudiaron las respuestas proporcionadas por el mismo para SPY y TC, seleccionados como antimicrobianos modelo para cada familia de antibióticos.

En primer lugar se evaluó la posible interferencia entre las respuestas analíticas proporcionadas por cada uno de los electrodos de trabajo del inmunosensor dual. Uno de los principales problemas que pueden producirse en el desarrollo de plataformas electroquímicas sensoras multianalito es la posible difusión de especies electroactivas a los electrodos adyacentes, afectando a las señales registradas con los mismos y dando lugar a resultados falsos [Escamilla-Gómez, 2009]. Con objeto de evaluar este posible efecto, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas con los electrodos de trabajo del electrodo serigrafiado dual en las condiciones optimizadas previamente, para diferentes disoluciones de leche en ausencia y en presencia de SPY y/o TC a sus LMRs. La **Figura 4.91** compara las señales amperométricas obtenidas para las cuatro disoluciones analizadas. Como se observa, las respuestas amperométricas registradas en presencia o ausencia de cada analito no varían significativamente con la presencia o ausencia del otro antibiótico en la disolución analizada, demostrando que no existe interferencia significativa entre las respuestas proporcionadas individualmente por cada uno de los electrodos de trabajo del inmunosensor dual.

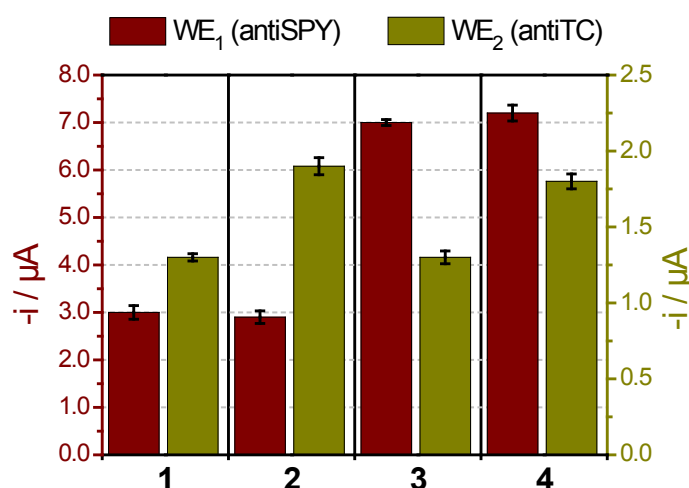


Figura 4.91. Respuestas amperométricas simultáneas registradas a -200 mV (vs. Ag) con el inmunosensor dual tras su incubación con disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con PBST, conteniendo: **1)** 100 ng mL^{-1} de SPY y 100 ng mL^{-1} de TC; **2)** 100 ng mL^{-1} de SPY y 0 de TC; **3)** 100 ng mL^{-1} de TC y 0 de SPY; **4)** 0 de SPY y 0 TC. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). WE: electrodo de trabajo.

Se evaluó también la selectividad del inmunosensor dual frente a otros antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias de antibióticos. Para ello se compararon las respuestas amperométricas obtenidas para SPY y TC en ausencia y presencia de dichas especies potencialmente interferentes. Se midieron diferentes disoluciones de leche conteniendo o no 100 ng mL^{-1} de SPY y TC en presencia de penicilina G, cefapirina y enrofloxacin o de una mezcla de éstos tres, en concentración $10 \text{ }\mu\text{M}$ cada uno. En la **Figura 4.92** se comparan las respuestas amperométricas obtenidas. Aunque se observó una pequeña interferencia en la determinación de sulfonamidas en presencia de la mezcla de PENG, CEF y ENRO y en la determinación de

tetraciclinas en presencia de PENG y de la mezcla de antibióticos, dicho efecto solo fue observable para un elevado exceso de los mismos, por lo que su influencia puede considerarse prácticamente despreciable en el análisis de muestras reales.

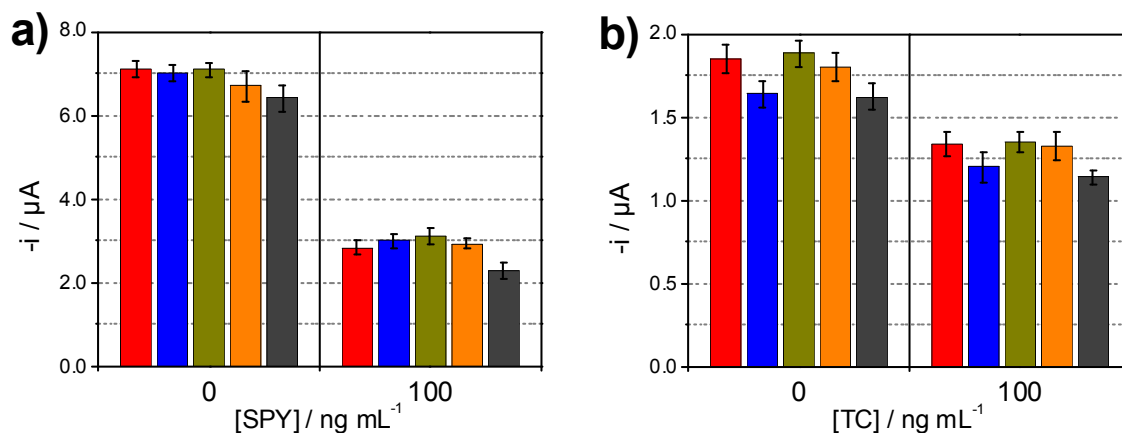


Figura 4.92. Respuestas amperométricas obtenidas con el inmunosensor dual tras su incubación en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con PBST preparadas en ausencia de interferente (■) y en presencia de un elevado exceso (10 μ M) de antibióticos potencialmente interferentes: penicilina G (■), cefapirina (■) y enrofloxacina (■), así como la mezcla de los mismos (10 μ M cada uno, ■). **a)** WE₁ (antiSPY), en ausencia y en presencia de 100 ng mL⁻¹ de SPY; **b)** WE₂ (antiTC), en ausencia y en presencia de 100 ng mL⁻¹ de TC. E_{ap} = -200 mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para n=3). WE: electrodo de trabajo.

4.5.3 Características analíticas del inmunosensor dual

Las características analíticas del inmunosensor desarrollado se evaluaron analizando disoluciones de leche entera UHT diluida con PBST (1:1) conteniendo distintas concentraciones de los analitos modelo seleccionados: SPY y TC. Las curvas de calibrado obtenidas en las condiciones de trabajo optimizadas se muestran en la **Figura 4.93**, siguiendo el hábito esperado para un ensayo competitivo.

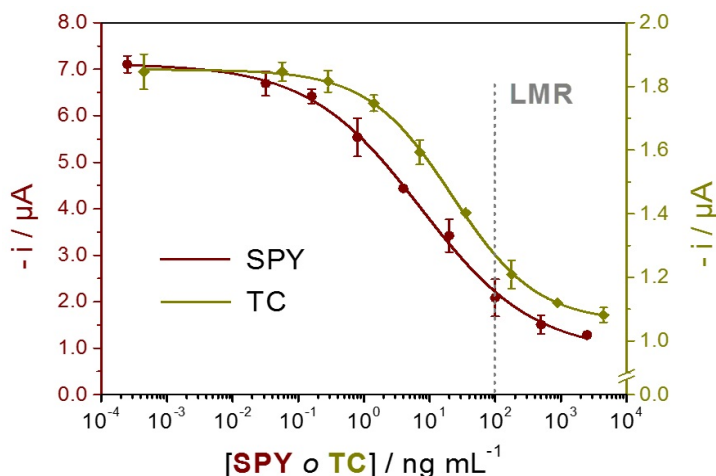


Figura 4.93. Curvas de calibrado obtenidas con el inmunosensor dual desarrollado para SPY y TC en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con PBST. E_{ap} = -200 mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para n=3). Se indica el LMR establecido en leche por la legislación Europea para ambos analitos.

Los correspondientes parámetros analíticos, IC_{50} , LD e ID se recogen en la **Tabla 4.14**. Los límites de detección obtenidos para ambos analitos cumplen con el requisito para el análisis de estos antibióticos en leche, ya que son entre 100 y 1000 veces inferiores a los LMRs establecidos por la legislación Europea.

Tabla 4.14. Características analíticas que resultan de las curvas de calibrado construidas con el inmunosensor dual para la determinación amperométrica de SPY y TC en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con PBST.

	SPY	TC
r^2	0.997	0.999
$IC_{50} / \text{ng mL}^{-1}$	7.4 ± 0.2	22.1 ± 0.2
$ID / \text{ng mL}^{-1}$	0.48 ± 0.01 a 113 ± 2	2.84 ± 0.02 a 171 ± 1
$LD / \text{ng mL}^{-1}$	0.097 ± 0.002	0.858 ± 0.006
LMR / $\mu\text{g kg}^{-1}$	100	100

Es interesante resaltar que las características analíticas obtenidas con este diseño de inmunosensor mejoran las conseguidas con el inmunosensor amperométrico integrado desarrollado para la determinación de sulfonamidas, preparado por inmovilización covalente de los anticuerpos de captura sobre la superficie electródica modificada con 4-ABA (**Tabla 4.15**). Este hecho confirma que la adecuada orientación de los anticuerpos de captura inmovilizados mejora significativamente la eficiencia de la reacción de reconocimiento lo que permite obtener un menor LD y un ID más amplio [Fowler, 2007; Liu, 2011].

Tabla 4.15. Comparación de las características analíticas obtenidas con los inmunosensores amperométricos desarrollados para la determinación de SPY en disoluciones de leche entera UHT diluida con PBST (1:1), inmovilizando los anticuerpos de captura antiSPY de manera covalente y de forma orientada empleando proteína G.

	Inmovilización covalente	Inmovilización orientada
r^2	0.996	0.997
$IC_{50} / \text{ng mL}^{-1}$	14 ± 1	7.4 ± 0.2
$ID / \text{ng mL}^{-1}$	1.6 ± 0.1 a 118 ± 9	0.48 ± 0.01 a 113 ± 2
$LD / \text{ng mL}^{-1}$	0.44 ± 0.04	0.097 ± 0.002
LMR / $\mu\text{g kg}^{-1}$	100	100

Se evaluó también la reproducibilidad de las medidas amperométricas obtenidas con diferentes inmunosensores duales preparados siguiendo el mismo protocolo tras incubarlos en disoluciones de leche entera UHT diluida 1:1 con PBST conteniendo las concentraciones optimizadas de los trazadores enzimáticos (en ausencia de SPY y TC). Las corrientes medidas con seis inmunosensores diferentes preparados el mismo día proporcionaron valores de RSD del 2.1 y 1.5 %, para los WE_1 (antiSPY) y WE_2 (antiTC), respectivamente. Trabajando con cuatro inmunosensores preparados en días diferentes se obtuvieron valores de RSD del 3.5 y 2.4 %. Estos resultados confirmaron la fiabilidad del proceso de fabricación de los inmunosensores duales, demostrando que es posible obtener respuestas amperométricas reproducibles trabajando con inmunosensores diferentes preparados de la misma manera.

La estabilidad del sensor amperométrico integrado dual se estudió preparando diferentes inmunosensores el mismo día y almacenándolos en seco a 4 °C. Las respuestas

amperométricas proporcionadas por los WE₁ y WE₂ se midieron periódicamente incubando los inmunosensores correspondientes en una disolución reciente de leche diluida 1:1 con PBST conteniendo las concentraciones optimizadas de los trazadores enzimáticos. La **Figura 4.94** muestra los gráficos de control construidos. El valor central de cada gráfico se tomó como el valor medio de las medidas realizadas el primer día del estudio con cinco inmunosensores diferentes, estableciéndose los límites de control superior e inferior como $\pm 3s$, siendo s la desviación estándar obtenida para dichos valores.

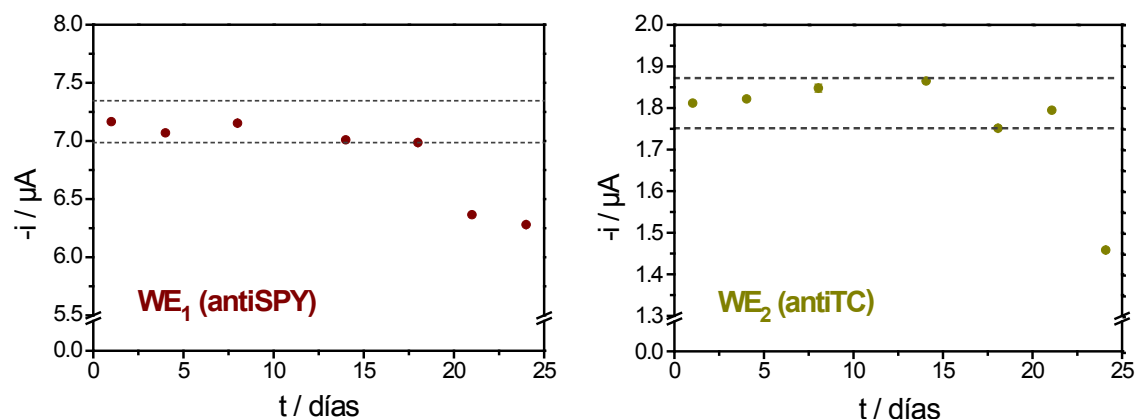


Figura 4.94. Gráficos de control construidos para el estudio de la estabilidad del inmunosensor dual almacenado en seco a 4 °C. Las señales corresponden a las medidas amperométricas a -200 mV (vs. Ag), realizadas tras la incubación de estos sensores en disoluciones de leche entera UHT:PBST (1:1) conteniendo SPY-HRP y TC-HRP (en ausencia de SPY y TC).

Como puede apreciarse, las respuestas obtenidas para ambos electrodos de trabajo permanecieron dentro de los límites de control durante al menos 18 días, confirmando la adecuada estabilidad del inmunosensor en las condiciones de almacenamiento descritas. Sin embargo, dicha estabilidad es menor que la observada para el inmunosensor de sulfonamidas descrito en el *Apartado 4.2.1*, lo que puede ser debido a la mayor labilidad de la interacción entre la proteína bacteriana y el anticuerpo, en comparación con la inmovilización covalente de éste último directamente sobre la superficie electródica.

4.5.4 Análisis de muestras de leche

La aplicabilidad del inmunosensor amperométrico dual en la determinación simultánea de residuos de sulfonamidas y tetraciclinas en leche se evaluó realizando estudios de recuperación para diferentes muestras. En primer lugar, se analizó por septuplicado una disolución de leche entera UHT:PBST (1:1) enriquecida con 9.6 ng mL^{-1} de SPY y 19.0 ng mL^{-1} de TC. La cuantificación se llevó a cabo interpolando las señales amperométricas correspondientes en las curvas de calibrado de la **Figura 4.93**, obteniéndose una concentración media de $(9.4 \pm 0.4) \text{ ng mL}^{-1}$ para SPY y de $(18.6 \pm 1.3) \text{ ng mL}^{-1}$ para TC, lo que implica recuperaciones medias de $(98 \pm 4) \%$ y $(98 \pm 6) \%$, respectivamente. Estos valores demostraron la utilidad y fiabilidad del inmunosensor dual desechable desarrollado para la determinación simultánea de residuos de sulfonamidas y tetraciclinas en leche.

Se analizó también una muestra de leche con un contenido certificado de oxitetraciclina (OTC) $< 5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. La posible existencia de efecto matriz en esta muestra certificada se evaluó

comparando las respuestas amperométricas obtenidas para disoluciones preparadas con este material de referencia reconstituido y con leche entera UHT:PBST (1:1) al enriquecer ambas disoluciones con 0 y 100 ng mL⁻¹ de SPY. Las respuestas obtenidas no presentaron diferencias significativas, por lo que la determinación de OTC en el material certificado se realizó por interpolación de las señales amperométricas registradas en una nueva curva de calibrado construida para este antibiótico en leche UHT (ver **Figura 4.95**).

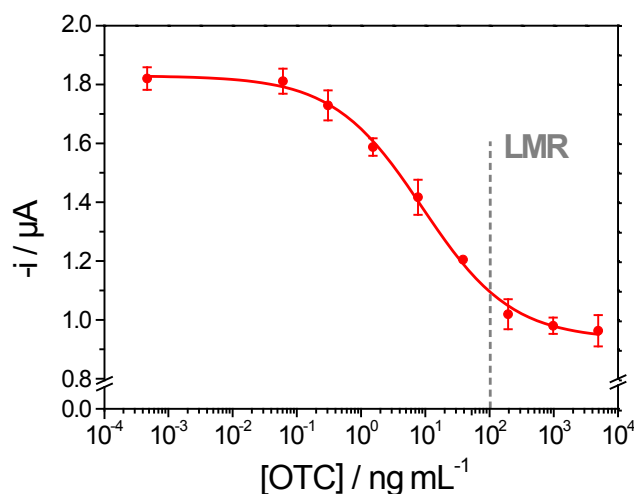


Figura 4.95. Curva de calibrado obtenida con el inmunosensor dual para OTC en disoluciones de leche entera UHT:PBST (1:1). $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se indica el LMR establecido en leche por la legislación Europea.

El análisis de cinco alícuotas de la muestra certificada proporcionó una concentración media de OTC de (4.5 ± 0.4) ng mL⁻¹, con una RSD = 7.9 %, valor coherente con el contenido certificado de OTC inferior a 5 ng mL⁻¹. Asimismo, se enriqueció este material de referencia con 100 ng mL⁻¹ de SPY y OTC y se procedió a su análisis con el inmunosensor. Tras el análisis de seis alícuotas se obtuvieron concentraciones medias de (102 ± 3) ng mL⁻¹ para SPY y (105 ± 5) ng mL⁻¹ para OTC (una vez sustraído el contenido previamente encontrado de OTC), con valores de RSD del 4.2 y 4.3 %, respectivamente. Estos resultados confirmaron una vez más la utilidad del inmunosensor desechable dual para la determinación de residuos de sulfonamidas y tetraciclinas en muestras de leche.

4.5.5 Conclusiones

El inmunosensor dual desarrollado permitió la determinación fiable, sensible y selectiva de residuos de sulfonamidas y tetraciclinas en leche en un corto tiempo de análisis, constituyendo el primer sensor electroquímico reportado para la determinación simultánea de residuos de estas dos familias de antibióticos.

El uso de proteínas bacterianas permitió la inmovilización orientada de los anticuerpos de captura empleados, consiguiendo así una disposición favorable de los mismos para el reconocimiento antigénico. Mediante la incorporación de la proteína G a la fabricación del inmunosensor, se obtuvo un amplio intervalo lineal y una elevada sensibilidad en la determinación de residuos de sulfonamidas y tetraciclinas.

Los resultados obtenidos demuestran la viabilidad del inmunosensor dual para la determinación simultánea de residuos de antibióticos pertenecientes a las familias de tetraciclinas y sulfonamidas, no observándose influencia significativa alguna entre las señales proporcionadas por cada uno de los electrodos de trabajo del SPdCE. Además, la posible interferencia de otros antimicrobianos potencialmente interferentes resultó ser prácticamente despreciable.

El inmunosensor dual presenta mejores características analíticas para la determinación de SPY que las obtenidas con el inmunosensor integrado descrito previamente, aunque éste presentó una mayor estabilidad de almacenamiento, con un ID aproximadamente un orden de magnitud más amplio y un LD más de cuatro veces inferior.

Los estudios de recuperación realizados, tanto en leche UHT como en un material de referencia con contenido certificado de OTC, demostraron que el inmunosensor integrado dual es aplicable a la determinación fiable y sensible de residuos de sulfonamidas y tetraciclinas en este tipo de matrices. Las excelentes características analíticas del inmunosensor dual desarrollado en términos de sensibilidad, selectividad, reproducibilidad y amplio intervalo cuantificable de concentraciones, aunadas a su rapidez, sencillez operativa y a su fácil automatización y miniaturización, hacen de este sistema sensor una interesante alternativa para la determinación multiplexada de residuos de sulfonamidas y tetraciclinas en leche.

4.6 Magnetosensor de afinidad para la multidetección de sulfonamidas, tetraciclinas y antibióticos β -lactámicos

Utilizando los fundamentos para el desarrollo de los magnetobiosensores descritos en apartados anteriores (4.1.1 a 4.1.3), se ha puesto a punto una metodología para la multidetección de residuos de antibióticos pertenecientes a las familias de las sulfonamidas, tetraciclinas y cefalosporinas mediante un magnetosensor amperométrico desechable de afinidad. La detección multiplexada implica la utilización de una mezcla de partículas magnéticas modificadas cada una con un receptor específico frente a cada familia de antibióticos y un ensayo competitivo directo incorporando trazadores enzimáticos (ver **Figura 4.96**). Tras la incubación de las partículas magnéticas modificadas con la disolución de la muestra y la posterior captura magnética de las mismas sobre un electrodo serigrafiado de carbono, se monitoriza la respuesta amperométrica medida a -200 mV (frente al electrodo de pseudo-referencia de Ag del SPCE) con el sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HQ}$. La metodología desarrollada permitió la discriminación entre muestras de leche (cruda y UHT) libres de o conteniendo residuos de antibióticos a los LMRs establecidos tras un breve y simple tratamiento de la muestra.

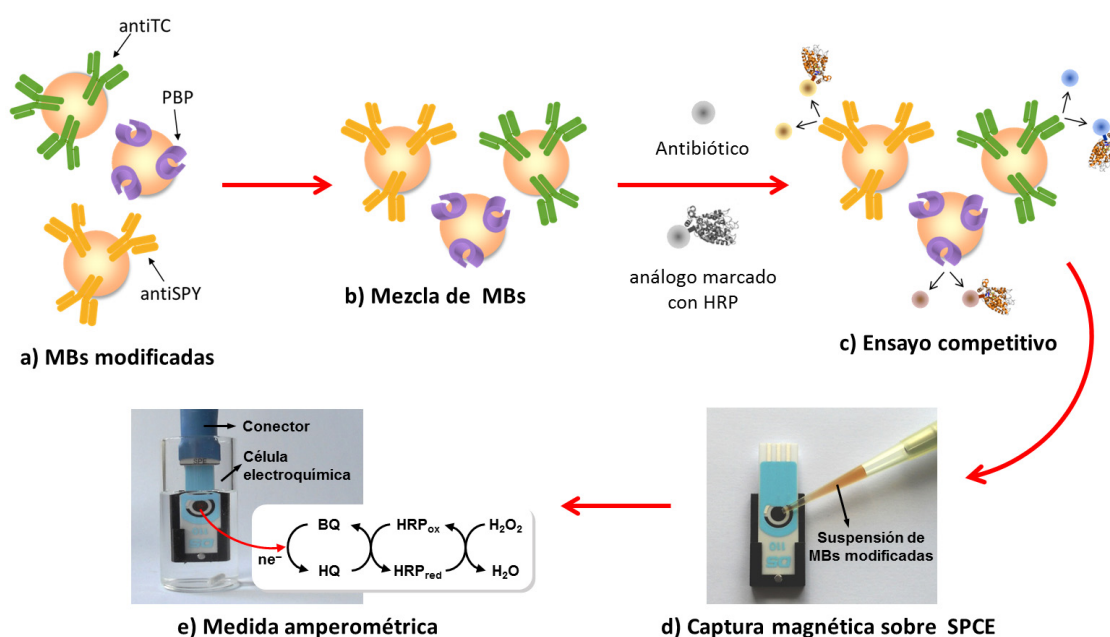


Figura 4.96. Representación esquemática del magnetosensor desarrollado para la multidetección de antibióticos. Los tres tipos de partículas modificadas con receptores biológicos selectivos para cada familia de antibióticos (**a**) se mezclan (**b**) y se incuban con la muestra en presencia de una concentración optimizada de trazadores enzimáticos (**c**), estableciéndose así el ensayo competitivo, posteriormente las MBs son capturadas magnéticamente sobre la superficie de un SPCE (**d**) y se procede a su medida electroquímica (**e**).

El magnetosensor desarrollado constituye el primer ejemplo descrito de un biosensor amperométrico de afinidad para realizar multidetección de residuos de antibióticos pertenecientes a las familias de las cefalosporinas, sulfonamidas y tetraciclinas en leche de vaca cruda o UHT, requiriendo en el caso de la primera sólo una simple y rápida etapa de tratamiento de la muestra consistente en su calentamiento a 80 °C durante 60 s, con la finalidad de inactivar térmicamente la lactoperoxidasa (LPO) endógena (ver *Apartado 3.4.14*).

4.6.1 Optimización de las variables experimentales

El magnetosensor desarrollado se basa en el uso de tres lotes diferentes de partículas magnéticas modificadas con receptores de afinidad selectivos frente a cada una de las familias de antibióticos a detectar. Dos lotes de partículas magnéticas funcionalizadas con proteína G se modificaron con los anticuerpos antiSPY y antiTC para la detección de sulfonamidas y tetraciclinas, respectivamente, mientras que un tercer lote de HisTag-MBs se modificó con la PBP recombinante para la detección de residuos de cefalosporinas.

Con la finalidad de obtener un sistema sensor capaz de detectar simultáneamente la presencia o ausencia de residuos de antibióticos pertenecientes a estas tres familias de antibióticos a los LMRs establecidos por la legislación Europea vigente, se optimizaron las variables experimentales implicadas en la modificación de las partículas magnéticas y en el funcionamiento del magnetosensor.

Cantidad de partículas magnéticas

El ensayo propuesto hace uso de tres tipos diferentes de partículas magnéticas modificadas, una para cada familia de antibióticos a detectar. Debido a que las MBs no son conductoras eléctricas, una elevada cantidad de partículas inmovilizadas sobre el electrodo de trabajo puede bloquear la transferencia electrónica. Para evitar esto, se intentó reducir la cantidad de partículas magnéticas empleadas en los magnetosensores descritos anteriormente para la determinación individual de residuos de cada una de las familias de antibióticos. Se decidió emplear la menor cantidad de MBs que proporcionara una marcada diferencia en los ensayos competitivos realizados individualmente para cada receptor biológico, en presencia y ausencia de los antibióticos modelo seleccionados para cada una de las familias, SPY, TC y CEF a sus respectivos LMRs.

a) MBs-antiSPY

Se varió la cantidad de la suspensión comercial de ProtG-MBs entre 1.0 y 5.0 µL, incubando en todos los casos con una disolución de antiSPY 50 µg mL⁻¹ en PBST. Para cada uno de los volúmenes estudiados, las MBs-antiSPY se incubaron en disoluciones de leche conteniendo 0, 100 ó 2500 ng mL⁻¹ de SPY, tras su dilución 1:1 con una alícuota de PBST conteniendo SPY-HRP para obtener una concentración final del trazador enzimático de 1.0 µg mL⁻¹. Las respuestas amperométricas obtenidas tras incubar las partículas magnéticas en estas disoluciones durante 30 min a 37 °C bajo agitación constante (600 rpm) se muestran en la **Figura 4.97**.

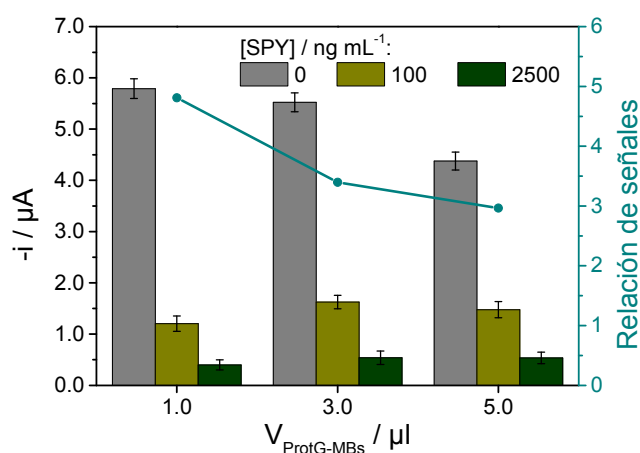


Figura 4.97. Dependencia de los valores de intensidad de corriente en estado estacionario con la cantidad de ProtG-MBs modificadas con antiSPY, tras su incubación con disoluciones de leche diluida 1:1 con PBST, en ausencia de antibióticos y en presencia de 100 ó 2500 ng mL^{-1} de SPY (concentraciones en leche sin diluir). $E_{\text{ap}} = -200 \text{ mV}$ (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestra también la relación obtenida entre los valores de intensidad de corriente en estado estacionario para muestras de leche en ausencia de antibiótico y en presencia de 100 ng mL^{-1} (LMR) de SPY.

Como puede observarse, la relación obtenida entre los valores de intensidad de corriente en estado estacionario para muestras de leche en ausencia de antibiótico o conteniendo 100 ng mL^{-1} (LMR) de SPY aumentó al disminuir el volumen de MBs, eligiéndose para experimentos posteriores un volumen de ProtG-MBs de 1.0 μL .

b) MBs-antiTC

Del mismo modo, para las partículas magnéticas modificadas con antiTC, se varió la cantidad de ProtG-MBs entre 1.0 y 5.0 μL , incubando estas partículas con una disolución de antiTC 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en PBST. Para cada uno de los volúmenes estudiados, las MBs-antiTC se incubaron durante 30 min a 37 °C bajo agitación constante (600 rpm) en disoluciones de leche conteniendo 0, 100 ó 4500 ng mL^{-1} de TC tras su dilución 1:1 con una alícuota de PBST conteniendo TC-HRP para obtener una dilución final del trazador enzimático 1/100. Las respuestas amperométricas obtenidas se muestran en la **Figura 4.98**.

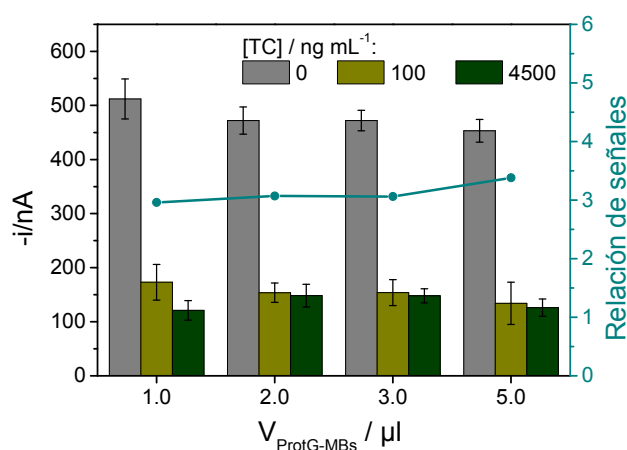


Figura 4.98. Dependencia de los valores de intensidad de corriente en estado estacionario con la cantidad de ProtG-MBs modificadas con antiTC, tras su incubación en disoluciones de leche diluida 1:1 con PBST, en ausencia de antibiótico y en presencia de 100 ó 4500 ng mL^{-1} de TC (concentraciones en leche sin diluir). $E_{\text{ap}} = -200 \text{ mV}$ (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestra también la relación obtenida entre los valores de intensidad de corriente en estado estacionario para muestras de leche en ausencia y en presencia de 100 ng mL^{-1} (LMR) de TC.

En este caso, la variación de la cantidad de partículas magnéticas no supuso un cambio significativo en la relación de señales amperométricas obtenidas en ausencia y en presencia de TC a su LMR (100 ng mL^{-1}), por lo que para experimentos posteriores también se seleccionó un volumen de $1.0 \text{ }\mu\text{L}$ de ProtG-MBs.

c) HisTag-MBs-PBP

Se optimizó también la cantidad de MBs modificadas con la PBP variando el volumen de la suspensión comercial de HisTag-MBs entre 1.0 y $3.0 \text{ }\mu\text{L}$, e incubando las partículas con una disolución de $70 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de PBP preparada en disolución reguladora B&W. Para cada uno de los volúmenes estudiados, las MBs-PBP se incubaron durante 30 min a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo agitación constante (600 rpm) en disoluciones de leche conteniendo 0 , 60 ó 4200 ng mL^{-1} de CEF, tras su dilución $1:1$ con una alícuota de PBST conteniendo PENG-HRP para obtener una dilución final del trazador enzimático $1/50$. Las respuestas amperométricas obtenidas se muestran en la **Figura 4.99**.

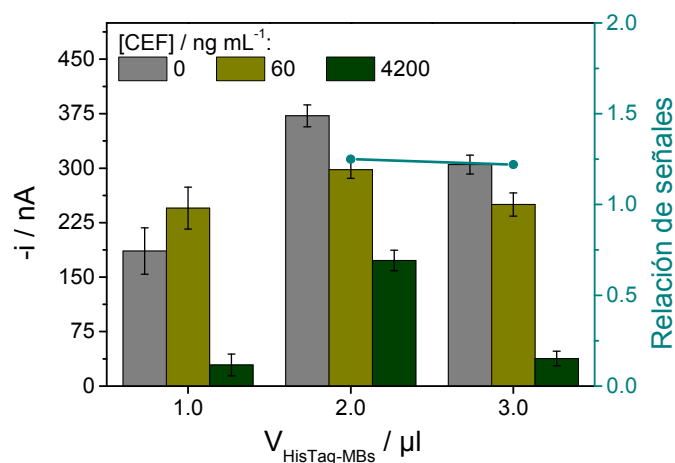


Figura 4.99. Dependencia de los valores de intensidad de corriente en estado estacionario con la cantidad de HisTag-MBs modificadas con PBP, tras su incubación en disoluciones de leche diluida $1:1$ con PBST en ausencia de antibiótico y en presencia de 60 ó 4200 ng mL^{-1} de CEF (concentraciones en leche sin diluir). $E_{\text{ap}} = -200 \text{ mV}$ (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestra también la relación obtenida entre los valores de intensidad de corriente en estado estacionario para muestras de leche en ausencia y en presencia de 60 ng mL^{-1} (LMR) de CEF.

No se observó una variación significativa entre la relación de señales amperométricas registradas en ausencia de antibiótico y en presencia de CEF a su LMR (60 ng mL^{-1}) para 2.0 y $3.0 \text{ }\mu\text{L}$ de MBs. Sin embargo, con $1.0 \text{ }\mu\text{L}$ de MBs no se obtuvo el adecuado reconocimiento del antibiótico bajo el ensayo competitivo propuesto, por lo que para experimentos posteriores se empleó un volumen HisTag-MBs de $2.0 \text{ }\mu\text{L}$.

Optimización de las respuestas amperométricas

Las elevadas respuestas amperométricas obtenidas con las MBs-antiSPY, en comparación con las proporcionadas por las MBs-PBP y MBs-antiTC, complicaban la multidetección de residuos de las tres familias de antibióticos en un mismo ensayo. Con objeto de obtener señales amperométricas de magnitudes similares y, por tanto, facilitar la

multidetección, se procedió a la optimización tanto de la cantidad de PBP inmovilizada sobre las HisTag-MBs como de la concentración de SPY-HRP.

a) Optimización de la cantidad de PBP inmovilizada

Esta variable se optimizó incubando un volumen de 2.0 μL de HisTag-MBs en disoluciones de PBP de 50, 70 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las partículas magnéticas así modificadas se incubaron 30 min a 25 $^{\circ}\text{C}$, bajo agitación constante (600 rpm) en disoluciones de leche conteniendo 0, 60 ó 4200 ng mL^{-1} de CEF, tras su dilución 1:1 con una disolución de PENG-HRP en PBST, para obtener una dilución final 1/50 del trazador enzimático. Las respuestas amperométricas obtenidas se muestran en la **Figura 4.100**.

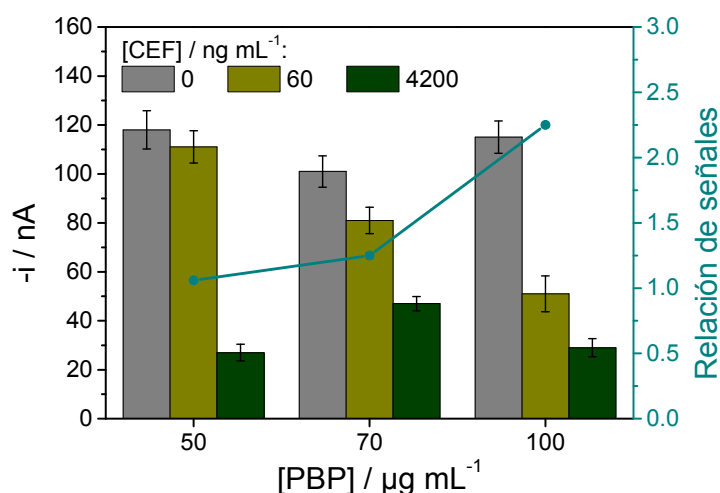


Figura 4.100. Dependencia de los valores de intensidad de corriente en estado estacionario con la cantidad de PBP inmovilizada sobre las HisTag-MBs, tras la incubación de las partículas modificadas en disoluciones de leche:PBST (1:1) en ausencia de antibiótico y en presencia de 60 ó 4200 ng mL^{-1} de CEF (concentraciones en leche sin diluir). $E_{\text{ap}} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestra también la relación obtenida entre los valores de intensidad de corriente en estado estacionario para muestras de leche en ausencia y en presencia de 60 ng mL^{-1} (LMR) de CEF.

Como se observa, aunque la señal amperométrica obtenida en ausencia de CEF no aumentó significativamente con la concentración de la disolución de PBP empleada para la modificación de las MBs, sí se observó una mejor competición en presencia de CEF a su LMR al aumentar la cantidad de PBP inmovilizada sobre las MBs, por lo que para experimentos posteriores las HisTag-MBs se incubaron en disoluciones de PBP de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

b) Optimización de la concentración de SPY-HRP

Para optimizar la concentración de SPY-HRP, las MBs-antiSPY se incubaron bajo agitación constante (600 rpm) y durante 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$ con disoluciones de leche conteniendo 0, 100 ó 2500 ng mL^{-1} de SPY, tras su dilución 1:1 con disoluciones de SPY-HRP en PBST, para obtener concentraciones finales del trazador enzimático comprendidas entre 0.05 y 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las respuestas amperométricas obtenidas se muestran en la **Figura 4.101**.

La disminución de la concentración del trazador enzimático supuso una disminución en las intensidades de corriente medidas, manteniéndose prácticamente constante la relación entre las señales correspondientes a las muestras analizadas en ausencia y en presencia de SPY a su LMR (100 ng mL^{-1}). Para experimentos posteriores se seleccionó una concentración de SPY-

HRP 0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$, lo que a su vez se tradujo en una reducción considerable en el consumo de este inmunorreactivo y por tanto en el coste final del magnetosensor para la multidetección.

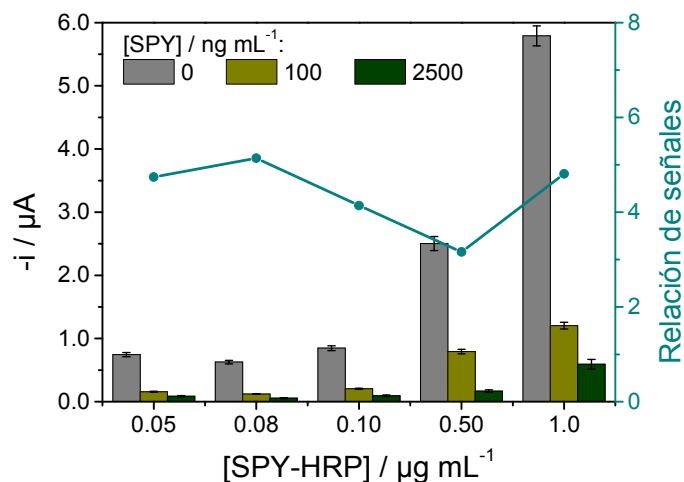


Figura 4.101. Dependencia de los valores de intensidad de corriente en estado estacionario con la concentración de SPY-HRP, tras la incubación de MBs-antiSPY en disoluciones de leche:PBST (1:1) en ausencia de antibiótico y en presencia de 100 ó 2500 ng mL^{-1} de SPY (concentraciones en leche sin diluir). $E_{ap} = -200 \text{ mV}$ (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$). Se muestra también la relación obtenida entre los valores de intensidad de corriente en estado estacionario para muestras de leche en ausencia y en presencia de 100 ng mL^{-1} (LMR) de SPY.

Detección simultánea de residuos de antibióticos

Una vez optimizadas individualmente las variables implicadas en la obtención de las respuestas amperométricas para los tres tipos de MBs modificadas, se procedió a la detección simultánea de las tres familias de residuos de antibióticos. Para ello, se incubó una mezcla de MBs-antiSPY, MBs-antiTC y MBs-PBP durante 30 min a 37 °C bajo agitación constante (600 rpm) en disoluciones de leche en ausencia de antibióticos libres o conteniendo SPY, TC o CEF a sus LMRs, tras la dilución 1:1 de dichas muestras de leche con una mezcla de los trazadores enzimáticos SPY-HRP, TC-HRP y PENG-HRP en PBST a sus concentraciones optimizadas. Las señales amperométricas que se muestran en la **Figura 4.102** permiten concluir que el magnetosensor es capaz de discriminar claramente entre leche libre de antibióticos o conteniendo SPY, TC o CEF a sus respectivos LMRs.

Optimización del tiempo de incubación durante la etapa de competición

Con el objetivo de que el biosensor permita la discriminación entre leche libre de antibióticos o que contenga residuos de éstos a los LMRs establecidos por la legislación en un corto tiempo de análisis, se estudió la dependencia de las señales amperométricas obtenidas con el tiempo de competición. La mezcla de MBs modificadas se incubó durante diferentes tiempos en disoluciones de leche en ausencia de antibióticos o conteniendo SPY, TC o CEF a sus LMRs, tras la dilución 1:1 de las muestras de leche con una disolución de SPY-HRP, TC-HRP y PENG-HRP a sus concentraciones optimizadas en PBST. Las señales amperométricas obtenidas se representan en la **Figura 4.103**.

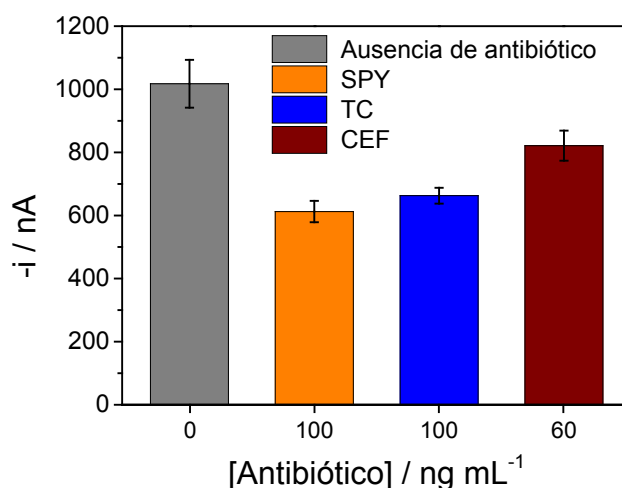


Figura 4.102. Valores de intensidad de corriente en estado estacionario obtenidos tras la incubación de la mezcla de MBs en disoluciones de leche:PBST (1:1) en ausencia de antibióticos y en presencia de 100 ng mL⁻¹ de SPY, 100 ng mL⁻¹ de TC o 60 ng mL⁻¹ de CEF (concentraciones en leche sin diluir). $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para n=3).

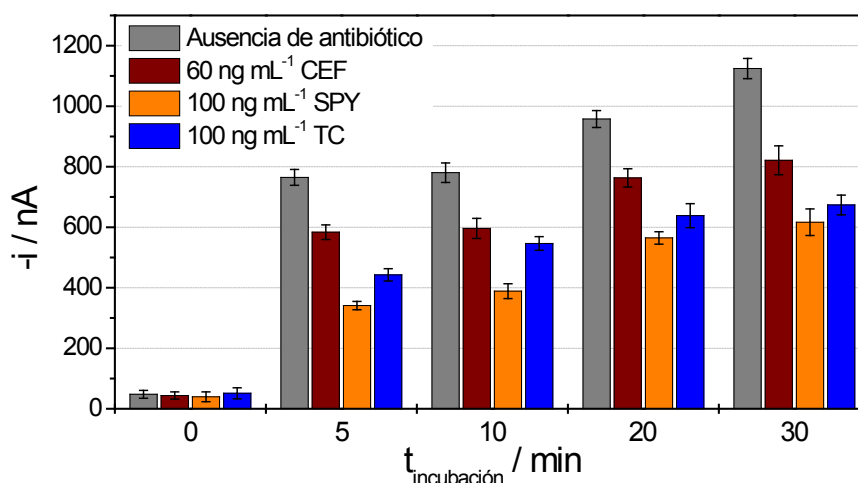


Figura 4.103. Dependencia de los valores de intensidad de corriente en estado estacionario con el tiempo de competición en la detección simultánea de residuos de antibióticos tras la incubación de la mezcla de MBs en disoluciones de leche:PBST (1:1) en ausencia de antibióticos y en presencia de 100 ng mL⁻¹ de SPY, 100 ng mL⁻¹ de TC o 60 ng mL⁻¹ de CEF (concentraciones en leche sin diluir). $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para n=3).

Como se puede observar, aunque como era de esperar los valores de corriente medidos disminuían con el tiempo de incubación, el proceso de competición no se vio afectado significativamente incluso con un tiempo tan corto como 5 minutos obteniéndose valores de corriente que permiten realizar la multidetección a los LMRs establecidos. Por consiguiente, se eligió dicho tiempo de incubación para desarrollar la metodología de trabajo.

Optimización de la temperatura de incubación durante la etapa de competición

Se evaluó también la posibilidad de realizar la detección de residuos de antibióticos a temperatura ambiente. Para ello se compararon las respuestas amperométricas obtenidas con el magnetosensor desarrollado tras incubar la mezcla de MBs modificadas a 25 ó 37 °C durante 5 min con agitación constante (600 rpm), en disoluciones de leche sin antibióticos o conteniendo SPY, TC o CEF a sus LMRs. Los resultados obtenidos demostraron que la relación de señales amperométricas no se ve afectada significativamente cuando la etapa de competición se lleva a cabo a 25 °C, lo que permite realizar la detección de residuos de antibióticos a temperatura ambiente.

4.6.2 Funcionamiento del magnetosensor desarrollado

El comportamiento analítico del magnetosensor para la multidetección de antibióticos en leche se evaluó en muestras de leche entera UHT contaminadas con CEF, SPY o TC (antimicrobianos representativos para cada familia de antibióticos) a sus respectivos LMRs, así como con mezclas binarias y ternarias de estos antibióticos. Las muestras de leche se diluyeron 1:1 con PBST conteniendo la mezcla de los trazadores enzimáticos a sus concentraciones optimizadas. Como se puede apreciar en la **Figura 4.104**, en todos los casos fue posible detectar la presencia de residuos de antibióticos. La magnitud de la corriente medida para la muestra de leche libre de antibióticos (barra 1 de la **Figura 4.104**) fue significativamente superior a los valores de corriente obtenidos para todas las muestras contaminadas ensayadas, siendo, como era de esperar, la muestra de leche contaminada con los tres antibióticos la que proporcionaba la menor señal amperométrica (barra 8 de la **Figura 4.104**). Estos resultados ponen de manifiesto la capacidad del magnetosensor para llevar a cabo la multidetección de residuos de antibióticos en leche a los LMRs establecidos por la legislación Europea.

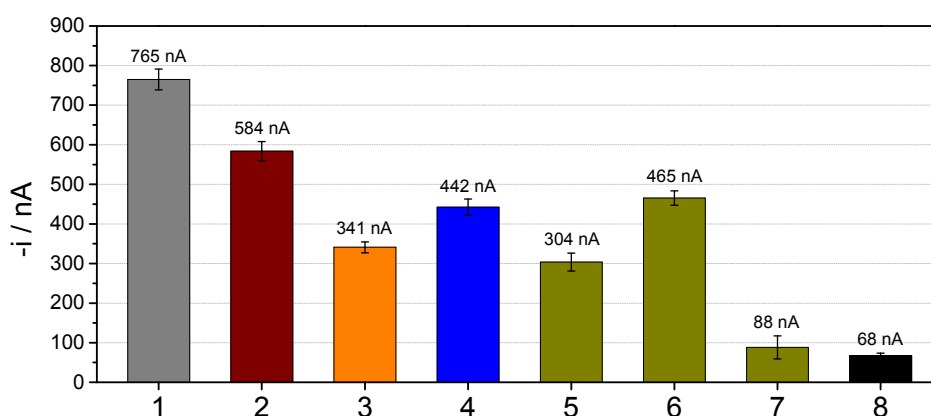


Figura 4.104. Valores de intensidad de corriente en estado estacionario obtenidos en la detección simultánea de residuos de antibióticos en disoluciones de leche diluida 1:1 con PBST: **1)** en ausencia de antibióticos, o conteniendo: **2)** CEF 60 ng mL⁻¹; **3)** SPY 100 ng mL⁻¹; **4)** TC 100 ng mL⁻¹; **5)** CEF 60 ng mL⁻¹ + SPY 100 ng mL⁻¹; **6)** CEF 60 ng mL⁻¹ + TC 100 ng mL⁻¹; **7)** SPY 100 ng mL⁻¹ + TC 100 ng mL⁻¹; **8)** CEF 60 ng mL⁻¹ + SPY 100 ng mL⁻¹ + TC 100 ng mL⁻¹. Concentraciones en leche sin diluir. E_{ap} = -200 mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para n=3).

Respuesta obtenida frente a diferentes antibióticos

Se evaluó también la respuesta proporcionada por el magnetosensor en el análisis genérico de antibióticos pertenecientes a las diferentes familias estudiadas, llevando a cabo medidas en muestras de leche que contienen otros antimicrobianos pertenecientes a las tres familias de antibióticos analizadas a sus respectivos LMRs. Puesto que para las sulfonamidas el LMR está establecido en $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para el contenido total de todas las sustancias pertenecientes a esta familia de antibióticos [EU 37/2010], se analizaron también muestras conteniendo mezclas de sulfonamidas a una concentración total de 100 ng mL^{-1} . En la **Figura 4.105** se muestra cómo los valores de intensidad de corriente obtenidos con el magnetosensor para todas las muestras de leche conteniendo los diferentes residuos de antibióticos, fueron significativamente inferiores al valor medido para la muestra de leche libre de antibióticos. Estos resultados indican claramente la posibilidad de discriminar muestras sin contaminar de muestras contaminadas a los LMRs establecidos.

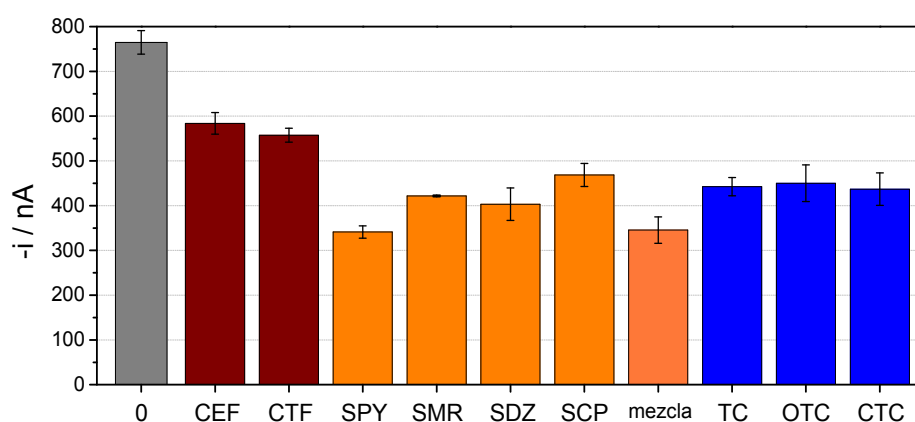


Figura 4.105. Valores de intensidad de corriente en el estado estacionario obtenidos en la detección de residuos de antibióticos, tras la incubación de la mezcla de MBs modificadas en disoluciones de leche diluida 1:1 con PBST: en ausencia de antibióticos (**0**) o en presencia de residuos de antibióticos a sus LMRs: cefalosporinas: 60 ng mL^{-1} de **CEF**, 100 ng mL^{-1} de **CTF**; sulfonamidas: 100 ng mL^{-1} de **SPY**, **SMR**, **SDZ** o **SCP**, o una **mezcla** de éstas a una concentración total de 100 ng mL^{-1} y tetraciclinas: 100 ng mL^{-1} de **TC**, **OTC** o **CTC** (concentraciones en leche sin diluir). $E_{ap} = -200 \text{ mV}$ (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$).

Reproducibilidad de las medidas amperométricas

Se evaluó la reproducibilidad de las respuestas amperométricas obtenidas con diferentes magnetosensores preparados siguiendo el protocolo descrito anteriormente el mismo día o en días diferentes. Se compararon las señales obtenidas en disoluciones de leche sin antibióticos diluidas 1:1 con PBST. Se obtuvo un valor de RSD del 2.9 % para las medidas realizadas con ocho magnetosensores preparados el mismo día, mientras que la RSD fue del 3.7 % para diez biosensores preparados y utilizados en días diferentes. Estos resultados demostraron la fiabilidad y reproducibilidad de los protocolos de fabricación y uso de los magnetosensores, incluyendo la modificación de las partículas magnéticas, su inmovilización por captura magnética sobre la superficie de los electrodos serigrafados y la medida amperométrica.

Estudio de estabilidad

Se estudió la estabilidad de la mezcla de MBs, preparando el mismo día diferentes lotes de partículas magnéticas modificadas con los receptores biológicos y almacenándolas a 4 °C en tubos de plástico con 50 μ L de PBS (pH 7.5). El día de preparación se incubaron ocho de estas mezclas de MBs en disoluciones de leche en ausencia de antibióticos diluidas 1:1 con PBST que contenían la cantidad optimizada de trazadores enzimáticos y se registraron las señales amperométricas correspondientes. En días posteriores se tomaron periódicamente tres de estas mezclas de MBs y se incubaron y utilizaron de la misma manera. El gráfico de control que recoge los datos obtenidos se presenta en la **Figura 4.106**. Como valor central se tomó el valor medio de la intensidad de corriente calculado a partir de las ocho medidas amperométricas realizadas el primer día del estudio, mientras que los límites de control superior e inferior se situaron al triple de la desviación estándar de estas medidas.

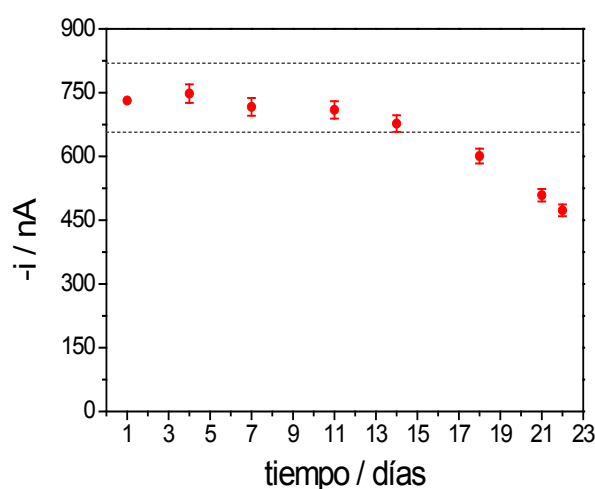


Figura 4.106. Gráfico de control construido para el estudio de la estabilidad de la mezcla de MBs modificadas con los tres receptores biológicos almacenadas a 4 °C en PBS (pH 7.5). $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para $n=3$).

Como puede observarse, las respuestas amperométricas obtenidas permanecieron dentro de los límites del gráfico de control durante 14 días, indicando una adecuada estabilidad de las MBs modificadas, que pueden ser preparadas y almacenadas hasta su uso.

4.6.3 Análisis de muestras de leche cruda

El magnetosensor desarrollado se aplicó al análisis de muestras de leche cruda contaminadas con diferentes residuos de antibióticos a los LMRs establecidos para los mismos. Como se aprecia en la **Figura 4.107**, las señales amperométricas obtenidas con el magnetosensor en leche cruda en ausencia de antibióticos y diluida 1:1 con PBST conteniendo las concentraciones óptimas de trazadores enzimáticos (barra 2), fue aproximadamente dos veces superior a la obtenida para leche entera UHT en las mismas condiciones (barra 1). La corriente que se muestra en la barra 2 es también similar a la medida en leche cruda sin suplementar con los trazadores enzimáticos. Este hecho puede atribuirse a la adsorción inespecífica de la LPO endógena que está presente a elevadas concentraciones en la leche cruda ($\sim 30 \mu\text{g mL}^{-1}$) y que cataliza la oxidación del H_2O_2 de manera similar a la HRP. Por lo tanto, fue necesario minimizar la

interferencia de la LPO para lo cual se aplicó un tratamiento térmico a las muestras de leche cruda consistente en su calentamiento a 80 °C durante 60 s (ver *Apartado 3.4.14*). Como se observa en la **Figura 4.107**, una vez efectuado dicho tratamiento se obtuvieron respuestas amperométricas similares a las medidas con la leche entera UHT (barra 3) debido a la desactivación de la LPO lo que da lugar a la eliminación de la interferencia observada. Se demostró que el tratamiento térmico aplicado a las muestras de leche cruda para la inactivación de la LPO no afectaba a la integridad de los residuos de antibióticos a determinar. Esta conclusión se alcanzó comparando las respuestas amperométricas obtenidas en leche cruda tratada térmicamente antes y después de enriquecerla con SPY, TC o CEF a sus respectivos LMRs. Como se observa claramente en la **Figura 4.107**, las señales amperométricas registradas fueron similares al aplicar el tratamiento térmico antes o después de la adición de los antibióticos, demostrando que la metodología desarrollada puede emplearse para la multidetección de residuos de antibióticos correspondientes a las familias de las sulfonamidas, tetraciclinas y cefalosporinas en leche cruda a los LMRs establecidos por la legislación.

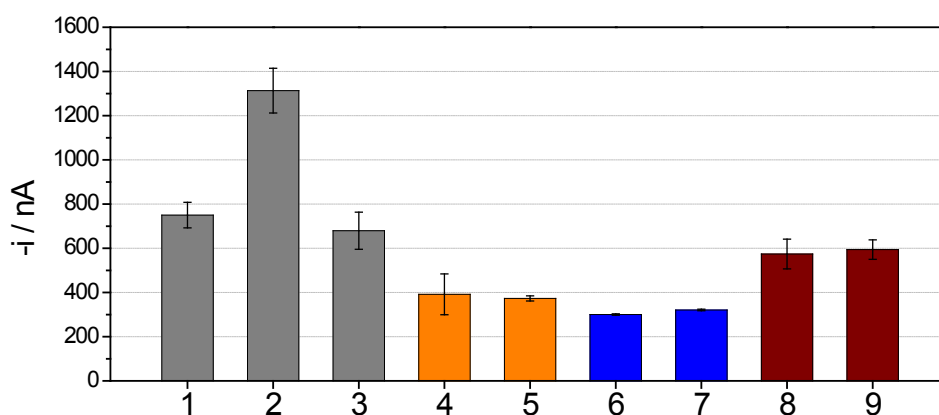


Figura 4.107. Valores de intensidad de corriente obtenidos en el estado estacionario en la detección de residuos de antibióticos tras la incubación de la mezcla de MBs en disoluciones de leche en ausencia de antibióticos: **1)** leche entera UHT; **2)** leche cruda; **3)** leche cruda tratada térmicamente, y disoluciones de leche cruda conteniendo: **4 y 5)** 100 ng mL⁻¹ de SPY; **6 y 7)** 100 ng mL⁻¹ de TC; **8 y 9)** 60 ng mL⁻¹ de CEF. Las disoluciones de leche cruda se trataron térmicamente (80 °C durante 60 s): antes (**4, 6 y 8**) o después (**5, 7 y 9**) de adicionar los antibióticos a la leche. $E_{ap} = -200$ mV (vs. Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (para n=3).

4.6.4 Conclusiones

El trabajo descrito constituyó el primer magnetobiosensor amperométrico de afinidad capaz de llevar a cabo multidetección de residuos de sulfonamidas, tetraciclinas y cefalosporinas en leche empleando una mezcla de MBs modificadas con receptores específicos para cada una de estas familias de antibióticos.

Se ha demostrado que es posible llevar a cabo la multidetección en sólo 5 min y a temperatura ambiente, características esenciales para desarrollar un método analítico de cribado asequible que pueda ser utilizado para la detección rutinaria de residuos de antibióticos en leche a los LMRs establecidos por la legislación vigente y para la discriminación entre muestras de leche que cumplen o no con dicha legislación.

La interferencia observada en el análisis de muestras de leche cruda debida a la presencia en gran cantidad de LPO endógena, se solventó de manera rápida y sencilla aplicando un tratamiento térmico (80 °C, 60 s) que asegura la completa inactivación de dicha enzima.

El magnetosensor desarrollado presentó una elevada reproducibilidad de las señales amperométricas medidas con diferentes magnetosensores preparados de la misma manera y una estabilidad de almacenamiento de la mezcla de MBs de 14 días.

Los resultados obtenidos demostraron la adecuación de la metodología desarrollada como método de cribado para la detección rápida, fiable y con coste asequible de residuos de antibióticos en leche cruda, sin necesidad de complejos o tediosos pretratamientos de muestra, requiriendo sólo un breve calentamiento y una dilución de la misma.

5. CONCLUSIONS

Although particular conclusions and achieved milestones have been highlighted in the individual chapters of this Thesis, a general conclusion of this research work is that new electrochemical biosensors and analytical strategies for the individual or multiplexed determination of antibiotic residues in milk have been developed. These biosensors and strategies, involving the use of suitable receptors, appropriate assays modes and novel immobilization approaches, have demonstrated to be competitive with other existing analytical procedures.

As it is pointed out for each specific case, the analytical characteristics achieved with the developed biosensors improve, in general, those reported with previous approaches, mainly in terms of operational simplicity, speed of analysis and sensitivity, either for the individual and the multiplexed determination of antibiotic residues at the Maximum Residue Limits (MRLs) stated by current legislations in milk.

The accomplished work involves the development of: i) four different magneto-biosensors for the individual determination of sulfonamide, tetracycline and β -lactam antibiotics and for the multiplexed detection of residues belonging to the cephalosporin, sulfonamide and tetracycline antibiotics families; ii) three integrated biosensors for the individual determination of β -lactam and sulfonamide antibiotics and the simultaneous determination of sulfonamide and tetracycline antibiotics. The developed methodologies can be implemented for the analysis in commercial milk with no need for sample treatment. In the case of raw milk, just a brief heat treatment was needed in order to eliminate LPO interference.

The development of the biosensors has involved the implementation, for the first time, of two extremely attractive biosensing platforms onto screen-printed carbon electrodes:

- a reliable and reproducible covalent immobilization protocol of biomolecules based on grafting of 4-ABA on carbon surfaces and further activation of the $-\text{COOH}$ groups through the active ester method.

- an innovative, simple, and one-step modification of carbon surfaces with a dense layer of long alkyl chain NTA ligands for reproducible, stable, reversible, and oriented immobilization of His-tagged recombinant proteins.

Furthermore, innovative, non conventional approaches involving techniques and methods that are not commonly used for analytical purposes have been developed in this work. In this way, it has been demonstrated that SECM in the generator/collector and feedback modes can be used for the qualitative and quantitative interrogation of immunosensing platforms. Moreover, a BFC has been constructed and employed for sulfonamide residues quantification. This work constitutes the first report describing the use of an immunologic-controlled biofuel cell as a biosensor, suggesting the possibility of developing self-powered biosensing systems.

In brief, it can be concluded that the developed biosensors and implemented methodologies can be envisaged as useful and interesting analytical tools able to be implemented in the dairy industry and in decentralized environments, as fast, reliable, alternative and competitive methods for detecting and quantifying antibiotic residues, belonging to the same or different antibiotic families, in milk without complex or time-consuming sample treatments. These novel analytical tools should contribute to assess milk quality and safety for further distribution or industrial production.

6. BIBLIOGRAFÍA

A [Abad, 2004]: E.M. Abad Villar. Desarrollo de sistemas automáticos para inmunoensayos con detección electroquímica. *Tesis Doctoral*. Universidad de Oviedo (2004).

[Adrian, 2008]: J. Adrian, D.G. Pinacho, B. Granier, J.-M. Diserens, F. Sánchez-Baeza, M.-P. Marco. A multianalyte ELISA for immunochemical screening of sulfonamide, fluoroquinolone and β -lactam antibiotics in milk samples using class-selective bioreceptors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (2008) 1703 – 1712.

[Adrian, 2009^a]: J. Adrian, H. Font, J.-M. Diserens, F. Sánchez-Baeza, M.-P. Marco. Generation of broad specificity antibodies for sulfonamide antibiotics and development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the analysis of milk samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (2009) 385 – 394.

[Adrian, 2009^b]: J. Adrian, S. Pasche, J.-M. Diserens, F. Sánchez-Baeza, H. Gao, M.-P. Marco, G. Voirin. Waveguide interrogated optical immunosensor (WIOS) for detection of sulfonamide antibiotics in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (2009) 3340 – 3346.

[Adrian, 2009^c]: J. Adrian, S. Pasche, D.G. Pinacho, H. Font, J.-M. Diserens, F. Sánchez-Baeza, B. Granier, G. Voirin, M.-P. Marco. Wavelength-interrogated optical biosensor for multi-analyte screening of sulfonamide, fluoroquinolone, β -lactam and tetracycline antibiotics in milk. *Trends in Analytical Chemistry*, 28 (2009) 769 – 777.

[Al-Jawadi, 2012]: E. Al-Jawadi, S. Pöller, R. Haddad, W. Schuhmann. NADH oxidation using modified electrodes based on lactate and glucose dehydrogenase entrapped between an electrocatalyst film and redox catalyst-modified polymers. *Microchimica Acta*, 177 (2012) 405 – 410.

[Almeida, 2011]: S.A.A. Almeida, F.T.C. Moreira, A.M. Heitor, M.C.B.S.M. Montenegro, G.G. Aguilar, M.G.F. Sales. Sulphonamide-imprinted sol-gel materials as ionophores in potentiometric transduction. *Materials Science and Engineering C*, 31 (2011) 1784 – 1790.

[Althaus, 2009]: R. Althaus, M.I. Berruga, A. Montero, M. Roca, M.P. Molina. Evaluation of a microbiological multi-residue system on the detection of antibacterial substances in ewe milk. *Analytica Chimica Acta*, 632 (2009) 156 – 162.

[Anderegg, 1982]: G. Anderegg. Critical Evaluation of Equilibrium Constants in Solution Part A: Stability Constants of Metal Complexes. Critical Survey of Stability Constants of NTA Complexes. *Pure and Applied Chemistry*, 54 (1982) 2693 – 2758.

[Anderson, 2005]: C.R. Anderson, H.S. Rupp, W.-H. Wu. Complexities in tetracycline analysis – chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1075 (2005) 23 – 32.

[Andrew, 2010]: Andrew. Dairy cattle antibiotic residue review (2010). En la página web de la *Animal Welfare Approved* (www.animalwelfareapproved.org).

[Armstrong, 2008]: D. Armstrong. Antibiotic use in farmed livestock (2008). En la página web de la *British Society of Animal Science* (www.bsas.org.uk).

[Arvand, 2011]: M. Arvand, F. Alirezanejad. Sulfamethoxazole-imprinted polymeric receptor as ionophore for potentiometric transduction. *Electroanalysis*, 23 (2011) 1948 – 1957.

[Asanuma, 2001]: H. Asanuma, T. Akiyama, K. Kajiya, T. Hishiya, M. Komiyama. Molecular imprinting of cyclodextrin in water for the recognition of nanometer-scaled guests. *Analytica Chimica Acta*, 435 (2001) 25 – 33.

B [Babington, 2012]: R. Babington, S. Matas, M.-P. Marco, R. Galve. Current bioanalytical methods for detection of penicillins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403 (2012) 1549 – 1566.

[Bacigalupo, 2008]: M.A. Bacigalupo, G. Meroni, F. Secundo, R. Lelli. Time-resolved fluoroimmunoassay for quantitative determination of ampicillin in cow milk samples with different fat contents. *Talanta*, 77 (2008) 126 – 130.

[Balizs, 2003]: G. Balizs, A. Hewitt. Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 492 (2003) 105 – 131.

[Bang-Ce, 2008]: Y. Bang-Ce, L. Songyang, Z. Peng, L. Xiao-hong. Simultaneous detection of sulfamethazine, streptomycin, and tylosin in milk by microplate-array based SMM-FIA. *Food Chemistry*, 106 (2008) 797 – 803.

[Barbosa, 2011]: A.M.J. Barbosa, T.A. de Araújo, M.A.G. Trindade, V.S. Ferreira. A simple method for electroanalytical determination of ceftiofur in UHT milk samples using square-wave voltammetry technique. *Journal of Applied Electrochemistry*, 41 (2011) 249 – 255.

[Bard, 2001]: A.J. Bard en *Scanning Electrochemical Microscopy*, Cap. 1 (Ed.: A.J. Bard, M.V. Mirkin), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Estados Unidos 2001, pp. 1-16.

[Barlow, 2011]: J. Barlow. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16 (2011) 383 – 407.

[Barton, 2000]: M.D. Barton. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews*, 13 (2000) 279 – 299.

[BCCDC, 2013]: Dairy safety notes: antibiotic residues in milk (2013). En la página web de la *British Columbia Centre for Disease Control* (www.bccdc.ca).

[Benito, 2006]: M.E. Benito Peña. Desarrollo y validación de métodos analíticos basados en nuevos elementos de reconocimiento molecular para la determinación de antibióticos β -lactámicos en muestras de interés agroalimentario y medioambiental. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid (2006).

[Benito-Peña, 2005]: E. Benito-Peña, M.C. Moreno-Bondi, G. Orellana, A. Maquieira, A. van Amerongen. Development of a novel and automated fluorescent immunoassay for the analysis of β -lactam antibiotics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 6635 – 6642.

[Berens, 2001]: C. Berens, A. Thain, R. Schroeder. A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9 (2001) 2549 – 2556.

[Bhinde, 2010]: T. Bhinde, S.M. Clarke, T.K. Phillips, T. Arnold, J.E. Parker. Crystalline structures of alkylamide monolayers adsorbed on the surface of graphite. *Langmuir*, 26 (2010) 8201 – 8206.

[Bickerstaffe, 2006]: A.K. Bickerstaffe, N.P. Cheah, S.M. Clarke, J.E. Parker, A. Perdigon, L. Messe, A. Inaba. The crystalline structures of carboxylic acid monolayers adsorbed on graphite. *Journal of Physical Chemistry B*, 110 (2006) 5570 – 5575.

[Björck, 1984]: L. Björck, G. Kronvall. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *The Journal of Immunology*, 133 (1984) 969 – 974.

[Blankespoor, 2005]: R. Blankespoor, B. Limoges, B. Schöllhorn, J.-L. Syssa-Magalé, D. Yazidi. Dense monolayers of metal-chelating ligands covalently attached to carbon electrodes electrochemically and their useful application in affinity binding of histidine-tagged proteins. *Langmuir*, 21 (2005) 3362 – 3375.

[Blel, 2001]: M. Blel, M.-F. Guingamp, J.-L. Gaillard, G. Humbert. Improvement of a method for the measurement of lactoperoxidase activity in milk. *International Dairy Journal*, 11 (2001) 795 – 799.

[Boscolo, 2009]: B. Boscolo, S.S. Leal, C.A. Salgueiro, E.M. Ghibaudi, C.M. Gomes. The prominent conformational plasticity of lactoperoxidase: A chemical and pH stability analysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794 (2009) 1041 – 1048.

[Bradford, 1976]: M.M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1976) 248 – 254.

[Braga, 2010]: O.C. Braga, I. Campestrini, I.C. Vieira, A. Spinelli. Sulfadiazine determination in pharmaceuticals by electrochemical reduction on a glassy carbon electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21 (2010) 813 – 820.

[Bremus, 2012]: A. Bremus, R. Dietrich, L. Dettmar, E. Usleber, E. Märtilbauer. A broadly applicable approach to prepare monoclonal anti-cephalosporin antibodies for immunochemical residue determination in milk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403 (2012) 503 – 515.

[Brodersen, 2000]: D.E. Brodersen, W.M. Clemons Jr., A.P. Carter, R.J. Morgan-Warren, B.T. Wimberly, V. Ramakrishnan. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell*, 103 (2000) 1143 – 1154.

C [CA, 2013]: Página web del *Codex Alimentarius* (www.codexalimentarius.org). Consultada en Octubre de 2013.

[CAC/MRL 2-2012]: Codex Alimentarius Commission. *Maximum residue limits for veterinary drugs in foods*. Updated as at the 35th session of the Codex Alimentarius Commission (2012) 1 – 40.

[Cacciatore, 2004]: G. Cacciatore, M. Petz, S. Rachid, R. Hakenbeck, A.A. Bergwerff. Development of an optical biosensor assay for detection of β -lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x*. *Analytica Chimica Acta*, 520 (2004) 105 – 115.

[Cai, 2004]: W. Cai, R.B. Gupta. Molecularly-imprinted polymers selective for tetracycline binding. *Separation and Purification Technology*, 35 (2004) 215 – 221.

[Cai, 2012]: M. Cai, L. Zhu, Y. Ding, J. Wang, J. Li, X. Du. Determination of sulfamethoxazole in foods based on CeO₂/chitosan nanocomposite-modified electrodes. *Materials Science and Engineering C*, 32 (2012) 2623 – 2627.

[Capita, 2013]: R. Capita, C. Alonso-Calleja. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53 (2013) 11 – 48.

[Carlet, 2012]: J. Carlet. World Alliance against antibiotic resistance (WAAR): safeguarding antibiotics. *Intensive Care Medicine*, 38 (2012) 1723 – 1724.

[Caro, 2005]: E. Caro, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, F. Borrull. Synthesis and application of an oxytetracycline imprinted polymer for the solid-phase extraction of tetracycline antibiotics. *Analytica Chimica Acta*, 552 (2005) 81 – 86.

[Casella, 2012]: I.G. Casella, M. Contursi, D. Gioia. Development of a liquid chromatography/amperometric detection method for the determination of multiresidue sulfonamide antibiotics in meat-based baby foods. *Electroanalysis*, 24 (2012) 2125 – 2133.

[Cederfur, 2003]: J. Cederfur, Y. Pei, M. Zihui, M. Kempe. Synthesis and screening of a molecularly imprinted polymer library targeted for penicillin G. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 5 (2003) 67 – 72.

[Centi, 2010]: S. Centi, A.I. Stoica, S. Laschi, M. Mascini. Development of an electrochemical immunoassay based on the use of an eight-electrodes screen-printed array coupled with magnetic beads for the detection of antimicrobial sulfonamides in honey. *Electroanalysis*, 22 (2010) 1881 – 1888.

[Cháfer-Pericás, 2010^a]: C. Cháfer-Pericás, A. Maquieira, R. Puchades, J. Miralles, A. Moreno, N. Pastor-Navarro, F. Espinós. Immunochemical determination of oxytetracycline in fish: comparison between enzymatic and time-resolved fluorometric assays. *Analytica Chimica Acta*, 662 (2010) 177 – 185.

[Cháfer-Pericás, 2010^b]: C. Cháfer-Pericás, A. Maquieira, R. Puchades. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 29 (2010) 1038 – 1049.

[CHF, 2010]: Gerhard Domagk (2010). En la página web de la *Chemical Heritage Foundation* (www.chemheritage.org).

[Chen, 2009]: L. Chen, X. Zhang, L. Sun, Y. Xu, Q. Zeng, H. Wang, H. Xu, A. Yu, H. Zhang, L. Ding. Fast and selective extraction of sulfonamides from honey based on magnetic molecularly imprinted polymer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (2009) 10073 – 10080.

[Chen, 2010]: B. Chen, M. Ma, X. Su. An amperometric penicillin biosensor with enhanced sensitivity based on co-immobilization of carbon nanotubes, hematein, and β -lactamase on glassy carbon electrode. *Analytica Chimica Acta*, 674 (2010) 89 – 95.

[Chen, 2011]: X. Chen, Z. Chen, J. Zhu, C. Xu, W. Yan, C. Yao. A novel H₂O₂ amperometric biosensor based on gold nanoparticles/self-doped polyaniline nanofibers. *Bioelectrochemistry*, 82 (2011) 87 – 94.

[Choi, 2006]: J.-W. Choi, Y.-K. Kim, H.-J. Kim, W. Lee, G.H. Seong. Lab-on-a-chip for monitoring the quality of raw milk. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (2006) 1229 – 1235.

[Choudhury, 2012]: R. Choudhury, S. Panda, D.V. Singh. Emergence and dissemination of antibiotic resistance: a global problem. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 30 (2012) 384 – 390.

[Clementi, 1991]: M.E. Clementi, S. Marini, S.C. Condo', B. Giardina. Antibodies against small molecules. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 27 (1991) 139 – 144.

[Clontech Lab., 2012]: TALON® Metal Affinity Resins User Manual (2012). En la página web de Clontech – Takara Bio Company (www.clontech.com)

[Coates, 1998]: A.I. Coates, M.P. Cook, R. Feezor, M.D. Schuh. Dependence of heme accessibility in horseradish peroxidase on Ca^{2+} . *Journal of Inorganic Biochemistry*, 72 (1998) 63 – 69.

[Cohen, 1961]: L.S. Cohen, L.E. Cluff. The sulfonamides. *The American Journal of Nursing*, 61 (1961) 54 – 58.

[Companyó, 2009]: R. Companyó, M. Granados, J. Guiteras, M.D. Prat. Antibiotics in food: legislation and validation of analytical methodologies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395 (2009) 877 – 891.

[Conzuelo, 2010]: F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, M.A. Ruiz, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón. An integrated amperometric biosensor for the determination of lactose in milk and dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010) 7141 – 7148.

[Cullor, 1994]: J.S. Cullor, A. van Eenennaam, I. Gardner, L. Perani, J. Dellinger, W.L. Smith, T. Thompson, M.A. Payne, L. Jensen, W.M. Guterbock. Performance of various tests used to screen antibiotic residues in milk samples from individual animals. *Journal of the AOAC International*, 77 (1994) 862 – 870.

D [Daprà, 2013]: J. Daprà, L.H. Lauridsen, A.T. Nielsen, N. Rozlosnik. Comparative study on aptamers as recognition elements for antibiotics in a label-free all-polymer biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 43 (2013) 315 – 320.

[Davies, 1994]: J. Davies. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264 (1994) 375 – 382.

[Davis, 2007]: F. Davis, S.P.J. Higson. Biofuel cells—Recent advances and applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 1224 – 1235.

[Davis, 2010]: F. Davis, S.P.J. Higson. Label-free immunochemistry approach to detect and identity antibiotics in milk. *Pediatric Research*, 67 (2010) 476 – 480.

[Keizer, 2008]: W. de Keizer, M.E. Bienenmann-Ploum, A.A. Bergwerff, W. Haasnoot. Flow cytometric immunoassay for sulfonamides in raw milk. *Analytica Chimica Acta*, 620 (2008) 142 – 149.

[Dequaire, 1999]: M. Dequaire, C. Degrand, B. Limoges. Biotinilation of screen-printed carbon electrodes through the electrochemical reduction of the diazonium salt of *p*-aminobenzoyl biocytin. *Journal of the American Chemical Society*, 121 (1999) 6946 – 6947.

[Di Corcia, 2002]: A. Di Corcia, M. Nazzari. Liquid chromatographic–mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *Journal of Chromatography A*, 974 (2002) 53 – 89.

[Díaz-González, 2005]: M. Díaz-González, D. Hernández-Santos, M.B. González-García, A. Costa-García. Development of an immunosensor for the determination of rabbit IgG using streptavidin modified screen-printed carbon electrodes. *Talanta*, 65 (2005) 565 – 573.

[Dillon, 2003]: P.P. Dillon, S.J. Daly, J.G. Browne, B.M. Manning, E. Loomans, A. van Amerongen, R. O’Kennedy. Application of an immunosensor for the detection of the β -lactam antibiotic, cephalexin. *Food and Agricultural Immunology*, 15 (2003) 225 – 234.

[Domagk, 1935]: G. Domagk. Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 61 (1935) 250 – 253.

E [EC 178/2002]: Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, L 31 (2002) 1 – 24.

[EC 1831/2003]: Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, L 268 (2003) 29 – 43.

[EC 23/1996]: Council Directive 96/23/EC. *Official Journal of the European Communities*, L 125 (1996) 10 – 32.

[EC 470/2009]: Regulation (EC) No 470/2009 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, L 152 (2009) 11 – 22.

[EC 657/2002]: Commission Decision 2002/657/EC. *Official Journal of the European Communities*, L 221 (2002) 8 – 36.

[EC 882/2004]: Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, L 165 (2004) 1 – 141.

[EEC 2377/90]: Council Regulation (EEC) No 2377/90. *Official Journal of the European Communities*, L 224 (1990) 1 – 8.

[EFSA, 2013]: Página web de la *European Food Safety Authority* (www.efsa.europa.eu). Consultada en Octubre de 2013.

[Eguílaz, 2010]: M. Eguílaz, M. Moreno-Guzmán, S. Campuzano, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón. An electrochemical immunosensor for testosterone using functionalized magnetic beads and screen-printed carbon electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2010) 517 – 522.

[Elgert, 1998]: K.D. Elgert, *Immunology: Understanding the immune system*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. (1998). pp. 58 – 78.

[El-Shahat, 2010]: M.F. El-Shahat, N. Burham, S.M.A. Azeem. Flow injection analysis-solid phase extraction (FIA-SPE) method for preconcentration and determination of trace

amounts of penicillins using methylene blue grafted polyurethane foam. *Journal of Hazardous Materials*, 177 (2010) 1054 – 1060.

[Ensafi, 2012]: A.A. Ensafi, A.R. Allafchian, B. Rezaei. Multiwall carbon nanotubes decorated with FeCr_2O_4 , a new selective electrochemical sensor for amoxicillin determination. *Journal of Nanoparticle Research*, 14 (2012) 1244 1 – 11.

[Escamilla, 2009]: V. Escamilla Gómez. Nuevos diseños de inmunosensores electroquímicos para aplicaciones en bioanálisis. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid (2009).

[Escamilla-Gómez, 2009]: V. Escamilla-Gómez, D. Hernández-Santos, M.B. González-García, J.M. Pingarrón-Carrazón, A. Costa-García. Simultaneous detection of free and total prostate specific antigen on a screen-printed electrochemical dual sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (2009) 2678 – 2683.

[EU 37/2010]: Commission Regulation (EU) No 37/2010. *Official Journal of the European Union*, L 15 (2010) 1 – 72.

F [Fan, 2007]: F.-R.F. Fan, J. Fernandez, B. Liu, J. Mauzeroll en *Handbook of Electrochemistry*, Cap. 12 (Ed.: C.G. Zoski), Elsevier, Amsterdam, Países Bajos 2007, pp. 471-540.

[Fan, 2013]: H. Fan, F. Jiao, H. Chen, F. Zhang, Q. Wang, P. He, Y. Fang. Qualitative and quantitative detection of DNA amplified with HRP-modified SiO_2 nanoparticles using scanning electrochemical microscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 47 (2013) 373 – 378.

[Fanjul-Bolado, 2008]: P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos, P.J. Lamas-Ardisana, A. Martín-Pernía, A. Costa-García. Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. *Electrochimica Acta*, 53 (2008) 3635 – 3642.

[Feng, 2001]: P. Feng, Y.F. Li, C.Z. Huang. Determination of chlortetracycline in body fluids with the complex cation of chlortetracycline–europium (III)–trioctylphosphine oxide by total internal reflected fluorescence at a water/tetrachloromethane interface. *Analytica Chimica Acta*, 442 (2001) 89 – 95.

[Fernández, 2010]: F. Fernández, K. Hegnerová, M. Piliarik, F. Sanchez-Baeza, J. Homola, M.-P. Marco. A label-free and portable multichannel Surface plasmon resonance immunosensor for *on site* analysis of antibiotics in milk samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2010) 1231 – 1238.

[Fernández-González, 2006]: A. Fernández-González, L. Guardia, R. Badía-Laiño, M.E. Díaz-García. Mimicking molecular receptors for antibiotics – analytical implications. *Trends in Analytical Chemistry*, 25 (2006) 949 – 957.

[Ferrini, 2008]: A.M. Ferrini, V. Mannoni, G. Carpico, G.E. Pellegrini. Detection and identification of β -lactam residues in milk using a hybrid biosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (2008) 784 – 788.

[FIL, 2013]: Página web de la *Federación Internacional de Lechería* (www.fil-idf.org). Consultada en Octubre de 2013.

[FitzGerald, 2007]: S. FitzGerald, N. O’Loan, R.I. McConnell, E.O. Benchikh, N.E. Kane. Stable competitive enzyme-linked immunosorbent assay kit for rapid measurement of 11 active

beta-lactams in milk, tissue, urine, and serum. *Journal of AOAC International*, 90 (2007) 334 – 342.

[Font, 2008]: H. Font, J. Adrian, R. Galve, M.-C. Estévez, M. Castellari, M. Gratacós-Cubarsí, F. Sánchez-Baeza, M.-P. Marco. Immunochemical assays for direct sulfonamide antibiotic detection in milk and hair samples using antibody derivatized magnetic nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (2008) 736 – 743.

[Fowler, 2007]: J.M. Fowler, M.C. Stuart, D.K.Y. Wong. Self-assembled layer of thiolated protein G as an immunosensor scaffold. *Analytical Chemistry*, 79 (2007) 350 – 354.

[Fránek, 1999]: M. Fránek, V. Kolář, A. Deng, S. Crooks. Determination of sulphadimidine (sulfamethazine) residues in milk, plasma, urine and edible tissues by sensitive ELISA. *Food and Agricultural Immunology*, 11 (1999) 339 – 349.

[Franeek, 2006]: M. Franeek, I. Diblikova, I. Cernoch, M. Vass, K. Hruska. Broad-specificity immunoassays for sulfonamide detection: immunochemical strategy for generic antibodies and competitors. *Analytical Chemistry*, 78 (2006) 1559 – 1567.

G [Galal Abdel Hameed, 2006]: K. Galal Abdel Hameed, G. Sender, A. Korwin-Kossakowska. Public health hazard due to mastitis in dairy cows. *Animal Science Papers and Reports*, 25 (2006) 73 – 85.

[Gao, 2013]: F. Gao, G.X. Zhao, H.C. Zhang, P. Wang, J.P. Wang. Production of monoclonal antibody against doxycycline for immunoassay of seven tetracyclines in bovine muscle and milk. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48 (2013) 92 – 100.

[Gaudin, 2001]: V. Gaudin, J. Fontaine, P. Maris. Screening of penicillin residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay: comparison of chemical and enzymatic sample pre-treatment. *Analytica Chimica Acta*, 436 (2001) 191 – 198.

[Gholivand, 2013]: M.B. Gholivand, H. Khani. Determination of tetracycline at a UV-irradiated DNA film modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, 25 (2013) 461 – 467.

[Gratacós, 2007]: M. Gratacós Cubarsí. Desarrollo de métodos rápidos para el análisis de residuos en producción animal. *Tesis Doctoral*. Universitat de Girona (2007).

[Grubelnik, 2001]: A. Grubelnik, C. Padeste, L. Tiefenauer. Highly sensitive enzyme immunoassays for the detection of β -lactam antibiotics. *Food and Agricultural Immunology*, 13 (2001) 161 – 169.

[Guardia, 2006]: L. Guardia, R. Badía, M.E. Díaz-García. Molecular imprinted ormosils for nafcillin recognition by room temperature phosphorescence optosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (2006) 1822 – 1829.

[Gustavsson, 2002^a]: E. Gustavsson, P. Bjurling, Å. Sternesjö. Biosensor analysis of penicillin G in milk based on the inhibition of carboxypeptidase activity. *Analytica Chimica Acta*, 468 (2002) 153 – 159.

[Gustavsson, 2002^b]: E. Gustavsson, P. Bjurling, J. Degelaen, Å. Sternesjö. Analysis of β -lactam antibiotics using a microbial receptor protein-based biosensor assay. *Food and Agricultural Immunology*, 14 (2002) 121 – 131.

[Gustavsson, 2004]: E. Gustavsson, J. Degelaen, P. Bjurling, Å. Sternesjö. Determination of β -lactams in milk using a surface plasmon resonance-based biosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2004) 2791 – 2796.

[Guzmán-Vázquez de Prada, 2005]: A. Guzmán-Vázquez de Prada, P. Martínez-Ruiz, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón. Solid-phase molecularly imprinted on-line preconcentration and voltammetric determination of sulfamethazine in milk. *Analytica Chimica Acta*, 539 (2005) 125 – 132.

H [Haddad, 2012]: R. Haddad, W. Xia, D.A. Guschin, S. Pöller, M. Shao, J. Vivekananthan, M. Muhler, W. Schuhmann. Carbon cloth/carbon nanotube electrodes for biofuel cells development. *Electroanalysis*, 25 (2013) 59 – 67.

[Haddour, 2005]: N. Haddour, S. Cosnier, C. Gondran. Electrogeneration of a poly(pyrrole)-NTA chelator film for a reversible oriented immobilization of histidine-tagged proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 127 (2005) 5752 – 5753.

[Harris, 2000]: A.G. Harris, S.L. Hazell, A.G. Netting. Use of digoxigenin-labelled ampicillin in the identification of penicillin-binding proteins in *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45 (2000) 591 – 598.

[Harris, 2007]: D.C. Harris. *Análisis químico cuantitativo*, 3ª ed. Reverté, S.A., Barcelona, España (2007) ISBN: 84-291-7224-6, pp. 444 – 445.

[He, 2007]: X. He, R. Yuan, Y. Chai, Y. Zhang, Y. Shi. A new antibody immobilization strategy based on electro-deposition of gold nanoparticles and Prussian Blue for label-free amperometric immunosensor. *Biotechnology Letters*, 29 (2007) 149 – 155.

[Hentschke, 1992]: R. Hentschke, B.L. Schürmann, J.P. Rabe. Molecular dynamics simulations of ordered alkane chains physisorbed on graphite. *Journal of Chemical Physics*, 96 (1992) 6213 – 6221.

[Hernandez, 2011]: K. Hernandez, R. Fernanadez-Lafuente. Control of protein immobilization: coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme and Microbial Technology*, 48 (2011) 107 – 122.

[Hernández-Santos, 2004]: D. Hernández-Santos, M. Díaz-González, M.B. González-Gracia, A. Costa-García. Enzymatic genosensor on streptavidin-modified screen-printed carbon electrodes. *Analytical Chemistry*, 76 (2004) 6887 – 6893.

[Hickey, 2007]: M.B. Hickey, M.L. Peterson, E.S. Manas, J. Alvarez, F. Haeffner, Ö. Almarsson. Hydrates and solid-state reactivity: a survey of β -lactam antibiotics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96 (2007) 1090 – 1099.

[Ho, 1999]: D. Ho. Bacteriologist Alexander Fleming. *Time*, 153 (1999) Nº 12.

[Ho, 2010]: J.A. Ho, W.-L. Hsu, W.-C. Liao, J.-K. Chiu, M.-L. Chen, H.-C. Chang, C.-C. Li. Ultrasensitive electrochemical detection of biotin using electrically addressable site-oriented antibody immobilization approach via aminophenyl boronic acid. *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2010) 1021 – 1027.

[Holstege, 2002]: D.M. Holstege, B. Puschner, G. Whitehead, F.D. Galey. Screening and mass spectral confirmation of β -lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 406 – 411.

[Honegger, 2005]: A. Honegger. Binding affinities of recombinant Protein L, Protein LA, Protein A, and Protein G Immunoglobulin binding domains. En la página web de *Atlas of Antibody Anatomy* (www.bioc.uzh.ch/antibody).

[Huet, 2010]: A.-C. Huet, T. Fodey, S.A. Haughey, S. Weigel, C. Elliott, P. Delahaut. Advances in biosensor-based analysis for antimicrobial residues in foods. *Trends in Analytical Chemistry*, 29 (2010) 1281 – 1294.

[Interchim, 2007]: IgG Binding to Protein A, G and L (2007). En la página web de *Protein A, G, L immunoreagents* (www.interchim.fr).

[Jamin, 1993]: M. Jamin, R. Hakenbeck, J.-M. Frere. Penicillin binding protein 2x as a major contributor to intrinsic β -lactam resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Federation of European Biochemical Societies*, 331 (1993) 101 – 104.

[Janek, 1998]: R.P. Janek, W.R. Fawcett. Impedance spectroscopy of self-assembled monolayers on Au(111): sodium ferrocyanide charge transfer at modified electrodes. *Langmuir*, 14 (1998) 3011 – 3018.

[Janeway, 2001]: C.A. Janeway Jr, P. Travers, M. Walport, *et al.* en *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 5ª ed. Garland Science, New York (2001). (www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27144/).

[Jeon, 2008^a]: M. Jeon, J. Kim, K.-J. Paeng, S.-W. Park, I.R. Paeng. Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk. *Microchemical Journal*, 88 (2008) 26 – 31.

[Jeon, 2008^b]: M. Jeon, I.R. Paeng. Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a sensitive immunoassay. *Analytica Chimica Acta*, 626 (2008) 180 – 185.

[Jeong, 2012]: S. Jeong, I.R. Paeng. Sensitivity and selectivity on aptamer-based assay: the determination of tetracycline residue in bovine milk. *The Scientific World Journal*, 2012 (2012) 1 – 10.

[Jiang, 2008]: Z. Jiang, Y. Li, A. Liang, A. Qin. A sensitive and selective immuno-nanogold resonance-scattering spectral method for the determination of trace penicillin G. *Luminescence*, 23 (2008) 157 – 162.

[Jiang, 2013]: W. Jiang, Z. Wang, R.C. Beier, H. Jiang, Y. Wu, J. Shen. Simultaneous determination of 13 fluoroquinolone and 22 sulfonamide residues in milk by a dual-colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytical Chemistry*, 85 (2013) 1995 – 1999.

[Jiao, 2013]: S.N. Jiao, P. Wang, G.X. Zhao, H.C. Zhang, J. Liu, J.P. Wang. Synthesis of novel hapten and production of generic monoclonal antibody for immunoassay of penicillins residues in milk. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48 (2013) 486 – 494.

[Jin, 2007]: L. Jin, X. Amaya-Mazo, M.E. Apel, S.S. Sankisa, E. Johnson, M.A. Zbyszynska, A. Han. Ca^{2+} and Mg^{2+} bind tetracycline with distinct stoichiometries and linked deprotonation. *Biophysical Chemistry*, 128 (2007) 185 – 196.

[Jing, 2010]: T. Jing, Y. Wang, Q. Dai, H. Xia, J. Niu, Q. Hao, S. Mei, Y. Zhou. Preparation of mixed-templates molecularly imprinted polymers and investigation of the recognition ability for tetracycline antibiotics. *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2010) 2218 – 2224.

K [Kantiani, 2009]: L. Kantiani, M. Farré, M. Sibum, C. Postigo, M. López de Alda, D. Barceló. Fully automated analysis of β -lactams in bovine milk by online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 81 (2009) 4285 – 4295.

[Katsounaros, 2012]: I. Katsounaros, W.B. Schneider, J.C. Meier, U. Benedikt, P.U. Biedermann, A.A. Auer, K.J.J. Mayrhofer. Hydrogen peroxide electrochemistry on platinum: towards understanding the oxygen reduction reaction mechanism. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14 (2012) 7384 – 7391.

[Khaskheli, 2008]: M. Khaskheli, R.S. Malik, M.A. Arain, A.H. Soomro, H.H. Arain. Detection of β -lactam antibiotic residues in market milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7 (2008) 682 – 685.

[Kim, 2009]: Y.S. Kim, J.H. Niazi, M.B. Gu. Specific detection of oxytetracycline using DNA aptamer-immobilized interdigitated array electrode chip. *Analytica Chimica Acta*, 634 (2009) 250 – 254.

[Kim, 2010]: Y.-J. Kim, Y.S. Kim, J.H. Niazi, M.B. Gu. Electrochemical aptasensor for tetracycline detection. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33 (2010) 31 – 37.

[Kim, 2014]: C.-H. Kim, L.-P. Lee, J.-R. Min, M.-W. Lim, S.-H. Jeong. An indirect competitive assay-based aptasensor for detection of oxytetracycline in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 51 (2014) 426 – 430.

[Kloth, 2009]: K. Kloth, M. Rye-Johnsen, A. Didier, R. Dietrich, E. Märklbauer, R. Niessner, M. Seidel. A regenerable immuno chip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk. *Analyst*, 134 (2009) 1433 – 1439.

[Knecht, 2004]: B.G. Knecht, A. Strasser, R. Dietrich, E. Märklbauer, R. Niessner, M.G. Weller. Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk. *Analytical Chemistry*, 76 (2004) 646 – 654.

[Kools, 2008]: S.A.E. Kools, J.F. Moltmann, T. Knacker. Estimating the use of veterinary medicines in the European Union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50 (2008) 59 – 65.

[Koprowski, 1993]: L. Koprowski, E. Kirchmann, L.E. Welch. The electrochemical oxidation of penicillins on gold electrodes. *Electroanalysis*, 5 (1993) 473 – 482.

[Korpimäki, 2004]: T. Korpimäki, V. Hagren, E.-C. Brockmann, M. Tuomola. Generic Isnthanide fluoroimmunoassay for the simultaneous screening of 18 sulfonamides using an engineered antibody. *Analytical Chemistry*, 76 (2004) 3091 – 3098.

[Kotouček, 1997]: M. Kotouček, J. Skopalová, D. Micháľková. Electroanalytical study of salazosulfapyridine and biseptol components at the mercury electrode. *Analytica Chimica Acta*, 353 (1997) 61 – 69.

[Kress, 2011]: C. Kress, E. Schneider, E. Usleber. Determination of penicillin and benzylpenicilloic acid in goat milk by enzyme immunoassays. *Small Ruminant Research*, 96 (2011) 160 – 164.

[Kumar, 2004]: K. Kumar, A. Thompson, A.K. Singh, Y. Chander, S.C. Gupta. Enzyme-linked immunosorbent assay for ultratrace determination of antibiotics in aqueous samples. *Journal of Environmental Quality*, 33 (2004) 250 – 256.

[Kuramitz, 2009]: H. Kuramitz. Magnetic microbead-based electrochemical immunoassays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394 (2009) 61 – 69.

[Kurittu, 2000^a]: J. Kurittu, S. Lönnberg, M. Virta, M. Karp. A group-specific microbiological test for the detection of tetracycline residues in raw milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2000) 3372 – 3377.

[Kurittu, 2000^b]: J. Kurittu, S. Lönnberg, M. Virta, M. Karp. Qualitative detection of tetracycline residues in milk with a luminescence-based microbial method: the effect of milk composition and assay performance in relation to an immunoassay and a microbial inhibition assay. *Journal of Food Protection*, 63 (2000) 953 – 957.

[Kussendrager, 2000]: K.D. Kussendrager, A.C.M. van Hooijdonk. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition*, 84 (2000) S19 – S25.

L [Lamar, 2007]: J. Lamar, M. Petz. Development of a receptor-based microplate assay for the detection of beta-lactam antibiotics in different food matrices. *Analytica Chimica Acta*, 586 (2007) 296 – 303.

[Lee, 2004]: J.K. Lee, Y.-G. Kim, Y.S. Chi, W.S. Yun, I.S. Choi. Grafting nitrilotriacetic groups onto carboxylic acid-terminated self-assembled monolayers on gold surfaces for immobilization of histidine-tagged proteins. *Journal of Physical Chemistry B*, 108 (2004) 7665 – 7673.

[Lequin, 2005]: R.M. Lequin. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51 (2005) 2415 – 2418.

[Li, 2007]: X. Li, Q. Geng, Y. Wang, Z. Si, W. Jiang, X. Zhang, W. Jin. Fabrication of active horseradish peroxidase micropatterns with a high resolution by scanning electrochemical microscopy. *Electroanalysis*, 19 (2007) 1734 – 1740.

[Li, 2010]: J. Li, F. Jiang, X. Wei. Molecularly imprinted sensor based on an enzyme amplifier for ultratrace oxytetracycline determination. *Analytical Chemistry*, 82 (2010) 6074 – 6078.

[Lian, 2012]: W. Lian, J. Huang, J. Yu, X. Zhang, Q. Lin, X. He, X. Xing, S. Liu. A molecularly imprinted sensor based on β -cyclodextrin incorporated multiwalled carbon nanotube and gold nanoparticles-polyamide amine dendrimer nanocomposites combining with water-soluble chitosan derivative for the detection of chlortetracycline. *Food Control*, 26 (2012) 620 – 627.

[Liang, 1996]: P. Liang, R.I. Sanchez, M.T. Martin. Electrochemiluminescence-based detection of β -lactam antibiotics and β -lactamases. *Analytical Chemistry*, 68 (1996) 2426 – 2431.

[Lien, 2011]: K.-Y. Lien, L.-Y. Hung, T.-B. Huang, Y.-C. Tsai, H.-Y. Lei, G.-B. Lee. Rapid detection of influenza A virus infection utilizing an immunomagnetic bead-based microfluidic system. *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011) 3900 – 3907.

[Life Tech. Corp., 2013^a]: Antibody Compatibility Table: Dynabeads® Protein A & Dynabeads® Protein G (2013). En la página web de *Life Technologies* (www.lifetechnologies.com)

[Life Tech. Corp., 2013^b]: Dynabeads® His-Tag Isolation & Pulldown (2013). En la página web de *Life Technologies* (www.lifetechnologies.com)

[Link, 2007]: N. Link, W. Weber, M. Fussenegger. A novel generic dipstick-based technology for rapid and precise detection of tetracycline, streptogramin and macrolide antibiotics in food samples. *Journal of Biotechnology*, 128 (2007) 668 – 680.

[Linsinger, 2005]: T. Linsinger. Comparison of a measurement result with the certified value. European Commission – *Joint Research Centre Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)*. Application Note 1 (2005).

[Liu, 2000]: J. Liu, L. Cheng, B. Liu, S. Dong. Covalent modification of a glassy carbon surface by 4-aminobenzoic acid and its application in fabrication of a polyoxometalates-consisting monolayer and multilayer films. *Langmuir*, 16 (2000) 7471 – 7476.

[Liu, 2006]: X. Liu, C. Ouyang, R. Zhao, D. Shangguan, Y. Chen, G. Liu. Monolithic molecularly imprinted polymer for sulfamethoxazole and molecular recognition properties in aqueous mobile phase. *Analytica Chimica Acta*, 571 (2006) 235 – 241.

[Liu, 2007]: W. Liu, Z. Zhang, Z. Liu. Determination of β -lactam antibiotics in milk using micro-flow chemiluminescence system with on-line solid phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, 592 (2007) 187 – 192.

[Liu, 2008]: M. Liu, Y. Qi, G. Zhao. Carboxyphenyl covalent immobilization of heme proteins and its favorable biocompatible electrochemical and electrocatalytic characteristics. *Electroanalysis*, 20 (2008) 900 – 906.

[Liu, 2011]: X. Liu, R. Zhao, W. Mao, H. Feng, X. Liu, D.K.Y. Wong. Detection of cortisol at a gold nanoparticle|protein G–DTBP-scaffold modified electrochemical immunosensor. *Analyst*, 136 (2011) 5204 – 5210.

[Liu, 2013]: B. Liu, B. Zhang, G. Chen, D. Tang. Biotin-avidin-conjugated metal sulfide nanoclusters for simultaneous electrochemical immunoassay of tetracycline and chloramphenicol. *Microchimica Acta*, DOI: 10.1007/s00604-013-1096-2.

[Lu, 2001]: W.P. Lu, E. Kincaid, Y. Sun, M.D. Bauer. Kinetics of β -lactam interactions with penicillin-susceptible and resistant penicillin-binding protein 2x proteins from *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (2001) 31494 – 31501.

[Lübke, 2000]: C. Lübke, M. Lübke, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson. Imprinted polymers prepared with stoichiometric template-monomer complexes: efficient binding of ampicillin from aqueous solutions. *Macromolecules*, 33 (2000) 5098 – 5105.

M [Maischberger, 2008]: T. Maischberger, T.-H. Nguyen, P. Sukyai, R. Kittl, S. Riva, R. Ludwig, D. Haltrich. Production of lactose-free galacto-oligosaccharide mixtures: comparison of

two cellobiose dehydrogenases for the selective oxidation of lactose to lactobionic acid. *Carbohydrate Research*, 343 (2008) 2140 – 2147.

[Makaraviciute, 2013]: A. Makaraviciute, A. Ramanaviciene. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 50 (2013) 460 – 471.

[Marín, 2003]: M. Marín, F. Gudíol. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21 (2003) 42 – 55.

[Martin, 1999]: D.S. Martin, P. Weightman, J.T. Gauntlett. The adsorption of n-dodecane and n-pentane onto highly oriented pyrolytic graphite studied by atomic force microscopy. *Surface Science*, 424 (1999) 187 – 198.

[Märtlbauer, 1994]: E. Märtlbauer, E. Usleber, E. Schneider, R. Dietrich. Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides. *Analyst*, 119 (1994) 2543 – 2548.

[Masawat, 2007]: P. Masawat, J.M. Slater. The determination of tetracycline residues in food using a disposable screen-printed gold electrode (SPGE). *Sensors and Actuators B*, 124 (2007) 127 – 132.

[Matheus, 2007]: P.R. Matheus, J.M. Abad, V.M. Fernández. Modification of gold surfaces for the oriented immobilization of recombinant form of horseradish peroxidase. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 30 (2007) 225 – 235.

[McGrath, 2005]: T. McGrath, A. Baxter, J. Ferguson, S. Haughey, P. Bjurling. Multi sulfonamide screening in porcine muscle using a surface plasmon resonance biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 529 (2005) 123 – 127.

[Meier, 1991]: H Meier, S. Kumaran, A.M. Danna, C. Tran-Minh. Rapid measurement of penicillin contained in complex media using enzyme-loaded glass electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 249 (1991) 405 – 411.

[Mendoza, 2006]: N. Mendoza. Actualidades farmacológicas. Penicilina. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 49 (2006) 1 – 2.

[Mendoza, 2007]: N. Mendoza. Actualidades farmacológicas. Cefalosporinas. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 50 (2007) 1 – 3.

[Mendoza, 2008]: N. Mendoza, A.E. Campos. Actualidades farmacológicas. Tetraciclinas. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 51 (2008) 1 – 3.

[Meyer, 1999]: U.J. Meyer, Z.-L. Zhi, E. Loomans, F. Spener, M. Meusel. Automated stand-alone flow injection immunoanalysis system for the determination of cephalexin in milk. *Analyst*, 124 (1999) 1605 – 1610.

[Moeller, 2007]: N. Moeller, E. Mueller-Seitz, O. Scholz, W. Hillen, A.A. Bergwerff, M. Petz. A new strategy for the analysis of tetracycline residues in foodstuffs by a surface plasmon resonance biosensor. *European Food Research and Technology*, 224 (2007) 285 – 292.

[Moina, 2012]: C. Moina, G. Ybarra. Fundamentals and applications of immunosensors, en *Advances in immunoassay technology*, Cap. 4 (Ed.: N.H.L. Chiu, T.K. Christopoulos), InTech, Rijeka, Croacia (2012) ISBN: 978-953-51-0440-7, pp. 65 – 80.

[**Momberg, 1984**]: A. Momberg, M.E. Carrera, D. von Baer, C. Bruhn, M.R. Smyth. The oxidative voltammetric behavior of some sulphonamides at the glassy carbon electrode. *Analytica Chimica Acta*, 159 (1984) 119 – 127.

[**Mullan, 2003**]: W.M.A. Mullan. Inhibitors in milk (2003). En la página web de la *Dairy Science and Food Technology* (www.dairyscience.info).

N [**Nagaraja, 2009**]: P. Nagaraja, A. Shivakumar, A. Kumar Shrestha. Development and evaluation of kinetic spectrophotometric assays for horseradish peroxidase by catalytic coupling of paraphenylenediamine and mequinol. *Analytical Sciences*, 25 (2009) 1243 – 1248.

[**Nagel, 2012**]: O.G. Nagel, M.C. Beltrán, M.P. Molina, R.L. Althaus. Novel microbiological system for antibiotic detection in ovine milk. *Small Ruminant Research*, 102 (2012) 26 – 31.

[**Neu, 1992**]: H.C. Neu. The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257 (1992) 1064 – 1073.

[**Neu, 1996**]: H.C. Neu, T.D. Gootz. Antimicrobial chemotherapy, en *Medical microbiology*, 4ª ed. Cap. 11 (Ed.: S. Baron), The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas, EE. UU. (1996) ISBN-10: 0-9631172-1-1.

[**Ni, 2011**]: Y. Ni, S. Li, S. Kokot. Simultaneous voltammetric analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Food Chemistry*, 124 (2011) 1157 – 1163.

[**Nieba, 1997**]: L. Nieba, S.E. Nieba-Axmann, A. Persson, M. Hämäläinen, F. Edebratt, A. Hansson, J. Lidholm, K. Magnusson, Å.F. Karlsson, A. Plückthun. BIACORE analysis of histidine-tagged proteins using a chelating NTA sensor chip. *Analytical Biochemistry*, 252 (1997) 217 – 228.

[**NMPF, 2013**]: National Milk Producers Federation. *Milk and dairy beef drug residue prevention. Producer manual of best management practices*. National Dairy FARM Program (2013).

O [**O'Connor, 2007**]: S. O'Connor, D.S. Aga. Analysis of tetracycline antibiotics in soil: advances in extraction, clean-up, and quantification. *Trends in Analytical Chemistry*, 26 (2007) 456 – 465.

[**Oka, 2000**]: H. Oka, Y. Ito, H. Matsumoto. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, 882 (2000) 109 – 133.

[**Oliveira, 2006**]: R.V. Oliveira, Q.B. Cass. Evaluation of liquid chromatographic behavior of cephalosporin antibiotics using restricted access medium columns for on-line simple cleanup of bovine milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2006) 1180 – 1187.

[**Ortiz de Montellano, 1988**]: P.R. Ortiz de Montellano, S.K. David, M.A. Ator, D. Tew. Mechanism-based inactivation of horseradish peroxidase by sodium azide. Formation of meso-azidoproporphyrin IX. *Biochemistry*, 27 (1988) 5470 – 5476.

P [**Palaharn, 2003**]: S. Palaharn, T. Charoenraks, N. Wangfuengkanagul, K. Grudpan, O. Chailapakul. Flow injection analysis of tetracycline in pharmaceutical formulation with pulsed amperometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 499 (2003) 191 – 197.

[Paleček, 2007]: E. Paleček, M. Fojta. Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing. *Talanta*, 74 (2007) 276 – 290.

[Park, 2004]: Park, In-Seon, D.-K. Kim, N. Kim. Characterization and food application of a potentiometric biosensor measuring β -lactam antibiotics. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14 (2004) 698 – 706.

[Parker, 2009]: C.O. Parker, I.E. Tothill. Development of an electrochemical immunosensor for aflatoxin M₁ in milk with focus on matrix interference. *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (2009) 2452 – 2457.

[Pastor-Navarro, 2007]: N. Pastor-Navarro, S. Morais, A. Maquieira, R. Puchades. Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues. Application to honey samples. *Analytica Chimica Acta*, 594 (2007) 211 – 218.

[Pastor-Navarro, 2009]: N. Pastor-Navarro, A. Maquieira, R. Puchades. Immuno-analytical determination of tetracycline and sulfonamide residues in edible products: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395 (2009) 907 – 920.

[Pedrero, 2012]: M. Pedrero, S. Campuzano, J.M. Pingarrón. Magnetic beads-based electrochemical sensors applied to the detection and quantification of bioterrorism/biohazard agents. *Electroanalysis*, 24 (2012) 470 – 482.

[Pellegrini, 2004]: G.E. Pellegrini, G. Carpico, E. Coni. Electrochemical sensor for the detection and presumptive identification of quinolone and tetracycline residues in milk. *Analytica Chimica Acta*, 520 (2004) 13 – 18.

[Peng, 2013]: J. Peng, G. Cheng, L. Huang, Y. Wang, H. Hao, D. Peng, Z. Liu, Z. Yuan. Development of a direct ELISA based on carboxy-terminal of penicillin-binding protein BlaR for the detection of β -lactam antibiotics in foods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405 (2013) 8925 – 8933.

[Petrović, 2008]: J.M. Petrović, V.R. Katić, D.D. Bugarski. Comparative examination of the analysis of β -lactam antibiotic residues in milk by enzyme, receptor-enzyme, and inhibition procedures. *Food Analytical Methods*, 1 (2008) 119 – 125.

[Pingarrón, 1992]: J.M. Pingarrón, A. Dominguez, L.M. Polo. Electroanalytical study of sulphamerazine at a glassy-carbon electrode and its determination in pharmaceutical preparations by HPLC with amperometric detection. *Talanta*, 39 (1992) 631 – 635.

[Pingarrón, 2003]: J.M. Pingarrón, P. Sánchez Batanero, *Química electroanalítica, fundamentos y aplicaciones*. Ed. Síntesis, Madrid, España (2003). ISBN: 84-7738-663-3.

[Pingarrón, 2008]: J.M. Pingarrón, P. Yáñez-Sedeño, A. González-Cortés. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta*, 53 (2008) 5848 – 5866.

[Pitarch, 1998]: J. Pitarch, M.F. Ruiz-López, E. Silla, J.-L. Pascual-Ahuir, I. Tuñón. Neutral and alkaline hydrolyses of model β -lactam antibiotics. An ab initio study of water catalysis. *Journal of the American Chemical Society*, 120 (1998) 2146 – 2155.

[Prasad, 2003]: B.B. Prasad, S. Banerjee. Preparation, characterization and performance of a silica gel bonded molecularly imprinted polymer for selective recognition and enrichment of β -lactam antibiotics. *Reactive & Functional Polymers*, 55 (2003) 159 – 169.

[Preechaworapun, 2006]: A. Preechaworapun, S. Chanuwatanakul, Y. Einaga, K. Grudpan, S. Motomizu, O. Chailapakul. Electroanalysis of sulfonamides by flow injection system/high-performance liquid chromatography coupled with amperometric detection using boron-doped diamond electrode. *Talanta*, 68 (2006) 1726 – 1731.

Q [Qiang, 2004]: Z. Qiang, C. Adams. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pK_a) for human and veterinary antibiotics. *Water Research*, 38 (2004) 2874 – 2890.

R [Rahman, 2008]: M.A. Rahman, H.-B. Noh, Y.-B. Shim. Direct electrochemistry of laccase immobilized on Au nanoparticles encapsulated-dendrimer bonded conducting polymer: application for a catechin sensor. *Analytical Chemistry*, 80 (2008) 8020 – 8027.

[Ramadan, 2011]: Q. Ramadan, A.M. Gijs. Simultaneous sample washing and concentration using a “trapping-and-releasing” mechanism of magnetic beads on a microfluidic chip. *Analyst*, 136 (2011) 1157 – 1166.

[Rao, 2000]: T.N. Rao, B.V. Sarada, D.A. Tryk, A. Fujishima. Electroanalytical study of sulfa drugs at diamond electrodes and their determination by HPLC with amperometric detection. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 491 (2000) 175 – 181.

[Raz, 2009]: S.R. Raz, M.G.E.G. Bremer, W. Haasnoot, W. Norde. Label-free and multiplex detection of antibiotic residues in milk using imaging Surface plasmon resonance-based immunosensor. *Analytical Chemistry*, 81 (2009) 7743 – 7749.

[Raz, 2011]: S.R. Raz, W. Haasnoot. Multiplex bioanalytical methods for food and environmental monitoring. *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (2011) 1526 – 1537.

[Reder-Christ, 2011]: K. Reder-Christ, G. Bendas. Biosensor applications in the field of antibiotic research – a review of recent developments. *Sensors*, 11 (2011) 9450 – 9466.

[Renedo, 2007]: O.D. Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J.A. Martínez. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, 73 (2007) 202 – 219.

[Rezaei, 2009]: B. Rezaei, S. Damiri. Electrochemistry and adsorptive stripping voltammetric determination of amoxicillin on a multiwalled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, 21 (2009) 1577 – 1586.

[Ricci, 2007]: F. Ricci, G. Volpe, L. Micheli, G. Palleschi. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Analytica Chimica Acta*, 605 (2007) 111 – 129.

[Rinken, 2006]: T. Rinken, H. Riik. Determination of antibiotic residues and their interaction in milk with lactate biosensor. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 66 (2006) 13 – 21.

[Roberts, 2011]: W.S. Roberts, F. Davis, S.D. Collyer, S.P.J. Higson. Construction and interrogation of enzyme microarrays using scanning electrochemical microscopy – optimisation of adsorption and determination of enzymatic activity. *Analyst*, 136 (2011) 5287 – 5293.

[Roca, 2011]: M. Roca, L. Villegas, M.L. Kortabitarte, R.L. Althaus, M.P. Molina. Effect of heat treatments on stability of β -lactams in milk. *Journal of Dairy Science*, 94 (2011) 1155 – 1164.

[Rodríguez, 1998]: M.A. Rodríguez, J. Gundián, J. Barreto, N. Lim, A. Areu, A. Pardo. Tetraciclinas. *Acta Médica*, 8 (1998) 75 – 79.

[Rodríguez, 2008]: A. Rodríguez, E. Valera, J. Ramón-Azcón, F.-J. Sanchez, M.-P. Marco L.M. Castañer. Single frequency impedimetric immunosensor for atrazine detection. *Sensors and Actuators B*, 129 (2008) 921 – 928.

[Rodríguez, 2010]: N. Rodríguez, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, A. Herrero. A multivariate multianalyte screening method for sulfonamides in milk based on front-face fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 657 (2010) 136 – 146.

[Ronkainen, 2010]: N.J. Ronkainen, H.B. Halsall, W.R. Heineman. Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39 (2010) 1747 – 1763.

S [Samanidou, 2007]: V.F. Samanidou, K.I. Nikolaidou, I.N. Papadoyannis. Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of seven tetracycline antibiotics residues in milk according to the European Union Decision 2002/657/EC. *Journal of Separation Science*, 30 (2007) 2430 – 2439.

[Samsonova, 2005]: Zh.V. Samsonova, O.S. Shchelokova, N.L. Ivanova, M. Yu. Rubtsova, A.M. Egorov. Enzyme-linked immunosorbent assay of ampicillin in milk. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41 (2005) 589 – 595.

[Santos, 2008]: D.P. Santos, M.F. Bergamini, M.V.B. Zanoni. Voltammetric sensor for amoxicillin determination in human urine using polyglutamic acid/glutaraldehyde film. *Sensors and Actuators B*, 133 (2008) 398 – 403.

[Sanvicens, 2011]: N. Sanvicens, I. Mannelli, J.-P. Salvador, E. Valera, M.-P. Marco. Biosensors for pharmaceuticals based on novel technology. *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (2011) 541 – 553.

[Sassolas, 2012]: A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30 (2012) 489 – 511.

[Sauerbrey, 1959]: G. Sauerbrey. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik*, 155 (1959) 206 – 222.

[Sensoy, 2009]: D. Sensoy, E. Cevher, A. Sarıcı, M. Yılmaz, A. Özdamar, N. Bergişadi. Bioadhesive sulfacetamide sodium microspheres: Evaluation of their effectiveness in the treatment of bacterial keratitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in a rabbit model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72 (2009) 487 – 495.

[Setford, 1999]: S.J. Setford, R.M. van Es, Y.J. Blankwater, S. Kröger. Receptor binding protein amperometric affinity sensor for rapid β -lactam quantification in milk. *Analytica Chimica Acta*, 398 (1999) 13 – 22.

[Shen, 2007]: J. Shen, F. Xu, H. Jiang, Z. Wang, J. Tong, P. Guo, S. Ding. Characterization and application of quantum dot nanocrystal-monoclonal antibody conjugates for the determination of sulfamethazine in milk by fluoroimmunoassay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389 (2007) 2243 – 2250.

[Shin, 2001]: K. Shin, H. Hayasawa, B. Lönnerdal. Purification and quantification of lactoperoxidase in human milk with use of immunoabsorbents with antibodies against recombinant human lactoperoxidase. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (2001) 984 – 989.

[Singh, 2002]: N. Singh, W.N. Gade, J. Singh. Purification of turnip peroxidase and its kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 32 (2002) 39 – 49.

[Skudar, 1999]: K. Skudar, O. Brüggemann, A. Wittelsberger, O. Ramström. Selective recognition and separation of β -lactam antibiotics using molecularly imprinted polymers. *Analytical Communications*, 36 (1999) 327 – 331.

[Song, 2010]: J. Song, R.-M. Wang, Y.-Q. Wang, Y.-R. Tang, A.-P. Deng. Hapten design, modification and preparation of artificial antigens. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 38 (2010) 1211 – 1218.

[Song, 2012^a]: K.-M. Song, E. Jeong, W. Jeon, M. Cho, C. Ban. Aptasensor for ampicillin using gold nanoparticle based dual fluorescence-colorimetric methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402 (2012) 2153 – 2161.

[Song, 2012^b]: H.Y. Song, X. Zhou, J. Hobley, X. Su. Comparative study of random and oriented antibody immobilization as measured by dual polarization interferometry and surface plasmon resonance spectroscopy. *Langmuir*, 28 (2012) 997 – 1004.

[Souza, 2008]: C.D. Souza, O.C. Braga, I.C. Vieira, A. Spinelli. Electroanalytical determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode. *Sensors and Actuators B*, 135 (2008) 66 – 73.

[Spinks, 2001]: C.A. Spinks, C.G. Schut, G.M. Wyatt, M.R.A. Morgan. Development of an ELISA for sulfachlorpyridazine and investigation of matrix effects from different sample extraction procedures. *Food Additives and Contaminants*, 18 (2001) 11 – 18.

[Stanciu, 2009]: L. Stanciu, Y.H. Won, M. Ganesana, S. Andreescu. Magnetic particle-based hybrid platforms for bioanalytical sensors. *Sensors*, 9 (2009) 2976 – 2999.

[Sternesjö, 1995]: Å. Sternesjö, C. Mellgren, L. Björck. Determination of sulfamethazine residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay. *Analytical Biochemistry*, 226 (1995) 175 – 181.

[Sternesjö, 2006]: Å. Sternesjö, E. Gustavsson. Biosensor analysis of β -lactams in milk using the carboxypeptidase activity of a bacterial penicillin binding protein. *Journal of AOAC International*, 89 (2006) 832 – 837.

[Stezowski, 1976]: J.J. Stezowski. Chemical-structural properties of tetracycline derivatives. 1. Molecular structure and conformation of the free base derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 98 (1976) 6012 – 6018.

[Stolker, 2005]: A.A.M. Stolker, U.A.Th. Brinkman. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. *Journal of Chromatography A*, 1067 (2005) 15 – 53.

[Strasser, 2003^a]: A. Strasser, R. Dietrich, E. Usleber, E. Märtlbauer. Immunochemical rapid test for multiresidue analysis of antimicrobial drugs in milk using monoclonal antibodies and hapten-glucose oxidase conjugates. *Analytica Chimica Acta*, 495 (2003) 11 – 19.

[Strasser, 2003^b]: A. Strasser, E. Usleber, E. Schneider, R. Dietrich, C. Bürk, E. Märtlbauer. Improved enzyme immunoassay for group-specific determination of penicillins in milk. *Food and Agricultural Immunology*, 15 (2003) 135 – 143.

[Stryer, 2003]: L. Stryer, J.M. Berg, J.L. Tymoczko. *Bioquímica*, 5^a ed. Reverté, S.A., Barcelona, España (2003) ISBN: 84-291-7484-9, pp. 921 – 950.

[Suárez, 2009]: G. Suárez, Y.-H. Jin, J. Auerswald, S. Berchtold, H.F. Knapp, J.-M. Diserens, Y. Leterrier, J.-A. E. Månson, G. Voirin. Lab-on-a-chip for multiplexed biosensing of residual antibiotics in milk. *Lab on a Chip*, 9 (2009) 1625 – 1630.

[Sun, 2012]: N. Sun, S. Wu, H. Chen, D. Zheng, J. Xu, Y. Ye. Determination of sulfamethoxazole in milk using molecularly imprinted polymer monolith microextraction coupled to HPLC. *Microchimica Acta*, 179 (2012) 33 – 40.

[Suryanarayanan, 2010]: V. Suryanarayanan, C.-T. Wu, K.-C. Ho. Molecularly imprinted electrochemical sensors. Molecularly imprinted electrochemical sensors. *Electroanalysis*, 22 (2010) 1795 – 1811.

[Švorc, 2012]: L. Švorc, J. Sochr, M. Rievaj, P. Tomčík, D. Bustin. Voltammetric determination of penicillin V in pharmaceutical formulations and human urine using a boron-doped diamond electrode. *Bioelectrochemistry*, 88 (2012) 36 – 41.

T [Tajima, 2011]: N. Tajima, M. Takai, K. Ishihara. Significance of antibody orientation unraveled: Well-oriented antibodies recorded high binding affinity. *Analytical Chemistry*, 83 (2011) 1969 – 1976.

[Thal, 2011]: J. Thal, M. Steffen, B. Meier, E. Schneider, A. Adriany, E. Usleber. Development of an enzyme immunoassay for the antibiotic cefquinome and its application for residue determination in cow's milk after therapeutical mastitis treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399 (2011) 1051 – 1059.

[Thavarungkul, 2007]: P. Thavarungkul, S. Dawan, P. Kanatharana, P. Asawatreratanakul. Detecting penicillin G in milk with impedimetric label-free immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 23 (2007) 688 – 694.

[Traviesa-Alvarez, 2007]: J.M. Traviesa-Alvarez, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel. Direct screening of tetracyclines in water and bovine milk using room temperature phosphorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 589 (2007) 51 – 58.

[Trilling, 2013]: A.K. Trilling, J. Beekwilder, H. Zuilhof. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. *Analyst*, 138 (2013) 1619 – 1627.

[Trotta, 2005]: F. Trotta, C. Baggiani, M.P. Luda, E. Drioli, T. Massari. A molecular imprinted membrane for molecular discrimination of tetracycline hydrochloride. *Journal of Membrane Science*, 254 (2005) 13 – 19.

V [Valat, 2000]: C. Valat, B. Limoges, D. Huet, J.-L. Romette. A disposable Protein A-based immunosensor for flow-injection assay with electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*, 404 (2000) 187 – 194.

[Valiokas, 2008]: R. Valiokas, G. Klenkar, A. Tinazli, A. Reichel, R. Tampé, J. Piehler, B. Liedberg. Self-assembled monolayers containing terminal mono-, bis-, and tris-nitrilotriacetic acid groups: characterization and application. *Langmuir*, 24 (2008) 4959 – 4967.

[Vallina-García, 2007]: R. Vallina-García, M.M. García-Suarez, M.T. Fernández-Abedul, F.J. Méndez, A. Costa-García. Oriented immobilisation of anti-pneumolysin Fab through a histidine tag for electrochemical immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 23 (2007) 210 – 217.

[Voort, 2005]: D. van der Voort, C.A. McNeil, R. Renneberg, J. Korf, W.T. Hermens, J.F.C. Glatz. Biosensors: basic features and application for fatty acid-binding protein, an early plasma marker of myocardial injury. *Sensors and Actuators B*, 105 (2005) 50 – 59.

[Vijayendran, 2001]: R.A. Vijayendran, D.E. Leckband. A quantitative assessment of heterogeneity for Surface-immobilized proteins. *Analytical Chemistry*, 73 (2001) 471 – 480.

[Virolainen, 2008]: N.E. Virolainen, M.G. Pikkemaat, J.W.A. Elferink, M.T. Karp. Rapid detection of tetracyclines and their 4-epimer derivatives from poultry meat with bioluminescent biosensor bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (2008) 11065 – 11070.

[Voorhies, 1958]: J.D. Voorhies, R.N. Adams. Voltammetry at solid electrodes. Anodic polarography of sulfa drugs. *Analytical Chemistry*, 30 (1958) 346 – 350.

W [Wang, 2006]: S. Wang, H.Y. Zhang, L. Wang, Z.J. Duan, I. Kennedy. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: a review. *Food Additives and Contaminants*, 23 (2006) 362 – 384.

[Wang, 2009^a]: J. Wang, H. Wu, C. Huang. Investigation on the amalgamation of gold nanorods by iodine and the detection of tetracycline. *Science in China Series B: Chemistry*, 52 (2009) 188 – 195.

[Wang, 2009^b]: L. Wang, Y.-Q. Li. Simultaneous determination of ten antibiotic residues in milk by UPLC. *Chromatographia*, 70 (2009) 253 – 258.

[Wang, 2011]: Y. Wang, J.G. Limon-Petersen, R.G. Compton. Measurement of the diffusion coefficients of $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ and $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ in aqueous solution using microelectrode double potential step chronoamperometry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 652 (2011) 13 – 17.

[Wang, 2012]: L. Wang, J. Wu, Q. Wang, C. He, L. Zhou, J. Wang, Q. Pu. Rapid and sensitive determination of sulfonamide residues in milk and chicken muscle by microfluidic chip electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (2012) 1613 – 1618.

[Wang, 2013]: Z. Wang, R.C. Beier, Y. Sheng, S. Zhang, W. Jiang, Z. Wang, J. Wang, J. Shen. Monoclonal antibodies with group specificity toward sulfonamides: selection of hapten and antibody selectivity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405 (2013) 4027 – 4037.

[Weber, 2005]: C.C. Weber, N. Link, C. Fux, A.H. Zisch, W. Weber, M. Fussenegger. Broad-spectrum protein biosensors for class-specific detection of antibiotics. *Biotechnology and Bioengineering*, 89 (2005) 9 – 17.

[Wei, 2011]: Z. Wei, J. Wang. Detection of antibiotic residues in bovine milk by a voltammetric electronic tongue system. *Analytica Chimica Acta*, 694 (2011) 46 – 56.

[Weigel, 1994]: L.M. Weigel, J.T. Belisle, J.D. Radolf, M.V. Norgard. Digoxigenin-ampicillin conjugate for detection of penicillin-binding proteins by chemiluminescence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38 (1994) 330 – 336.

[Wessels, 1998]: J.M. Wessels, W.E. Ford, W. Szymczak, S. Schneider. The complexation of tetracycline and anhydrotetracycline with Mg^{2+} and Ca^{2+} : a spectroscopic study. *Journal of Physical Chemistry B*, 102 (1998) 9323 – 9331.

[Won, 2013]: S.-Y. Won, P. Chandra, T.S. Hee, Y.-B. Shim. Simultaneous detection of antibacterial sulfonamides in a microfluidic device with amperometry. *Biosensors and Bioelectronics*, 39 (2013) 204 – 209.

X [Xiong, 2006]: Y. Xiong, H. Zhou, Z. Zhang, D. He, C. He. Molecularly imprinted on-line solid-phase extraction combined with flow-injection chemiluminescence for the determination of tetracycline. *Analyst*, 131 (2006) 829 – 834.

[Xu, 2010]: X. Xu, Y. Feng, J. Li, F. Li, H. Yu. A novel protocol for covalent immobilization of thionine on glassy carbon electrode and its application in hydrogen peroxide biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2010) 2324 – 2328.

Y [Yang, 2008]: T. Yang, S. Berber, J.-F. Liu, G.P. Miller, D. Tománek. Self-assembly of long chain alkanes and their derivatives on graphite. *Journal of Chemical Physics*, 128 (2008) 124709-1 – 124709-8.

Z [Zacco, 2007]: E. Zacco, J. Adrian, R. Galve, M.-P. Marco, S. Alegret, M.I. Pividori. Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 2184 – 2191.

[Zeng, 2013]: K. Zeng, J. Zhang, Y. Wang, Z.H. Wang, S.X. Zhang, C.M. Wu, J.Z. Shen. Development of a rapid multi-residue assay for detecting β -lactams using penicillin binding protein 2x*. *Biomedical and Environmental Sciences*, 26 (2013) 100 – 109.

[Zhang, 2006]: X. Zhang, X. Peng, W. Jin. Scanning electrochemical microscopy with enzyme immunoassay of the cancer-related antigen CA15-3. *Analytica Chimica Acta*, 558 (2006) 110 – 114.

[Zhang, 2007]: Y. Zhang, S. Lu, W. Liu, C. Zhao, R. Xi. Preparation of anti-tetracycline antibodies and development of an indirect heterologous competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracycline in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007) 211 – 218.

[Zhang, 2009]: H. Zhang, S. Wang. Review on enzyme-linked immunosorbent assays for sulfonamide residues in edible animal products. *Journal of Immunological Methods*, 350 (2009) 1 – 13.

[Zhang, 2010^a]: J. Zhang, B. Zhang, Y. Wu, S. Jia, T. Fan, Z. Zhang, C. Zhang. Fast determination of the tetracyclines in milk samples by the aptamer biosensor. *Analyst*, 135 (2010) 2706 – 2710.

[Zhang, 2010^b]: Y. Zhang, Y. Jiang, S. Wang. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect benzylpenicilloic acid, a degradation product of penicillin G in adulterated milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010) 8171 – 8175.

[Zhang, 2010^c]: X. Zhang, L. Chen, Y. Xu, H. Wang, Q. Zeng, Q. Zhao, N. Ren, L. Ding. Determination of β -lactam antibiotics in milk based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 878 (2010) 3421 – 3426.

[Zhang, 2011]: H. Zhang, S. Wang, G. Fang. Applications and recent developments of multi-analyte simultaneous analysis by enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Immunological Methods*, 368 (2011) 1 – 23.

[Zhang, 2013]: J. Zhang, Z. Wang, K. Wen, X. Liang, J. Shen. Penicillin-binding protein 3 of *Streptococcus pneumoniae* and its application in screening of β -lactams in milk. *Analytical Biochemistry*, 442 (2013) 158 – 165.

[Zheng, 2001]: N. Zheng, Q. Fu, Y.-z. Li, W.-b. Chang, Z.-m. Wang, T.-j. Li. Chromatographic characterization of sulfonamide imprinted polymers. *Microchemical Journal*, 69 (2001) 153 – 158.

[Zheng, 2004]: N. Zheng, Y.-Z. Li, M.-J. Wen. Sulfamethoxazole-imprinted polymer for selective determination of sulfamethoxazole in tablets. *Journal of Chromatography A*, 1033 (2004) 179 – 182.

[Zhi, 2001]: Z.-L. Zhi, U.J. Meyer, J.W. Van den Bedem, M. Meusel. Evaluation of an automated and integrated flow-through immunoanalysis system for the rapid determination of cephalixin in raw milk. *Analytica Chimica Acta*, 442 (2001) 207 – 219.

[Zhou, 2012]: L. Zhou, D.-J. Li, L. Gai, J.-P. Wang, Y.-B. Li. Electrochemical aptasensor for the detection of tetracycline with multi-walled carbon nanotubes amplification. *Sensors and Actuators B*, 162 (2012) 201 – 208.

[Zhu, 2011]: K. Zhu, J. Li, Z. Wang, H. Jiang, R.C. Beier, F. Xu, J. Shen, S. Ding. Simultaneous detection of multiple chemical residues in milk using broad-specificity antibodies in a hybrid immunosorbent assay. *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011) 2716 – 2719.

[Zwald, 2004]: A.G. Zwald, P.L. Ruegg, J.B. Kaneene, L.D. Warnick, S.J. Wells, C. Fossler, L.W. Halbert. Management practices and reported antimicrobial usage on conventional and organic dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 87 (2004) 191 – 201.

ANEXOS

Resumen en inglés

Símbolos y abreviaturas

Symbols and Abbreviations

Publicaciones derivadas de la
presente Tesis Doctoral

Resumen en inglés

Antibiotics are chemical substances extremely active even at low doses. As they can prevent the development of bacteria and bacterial infections, antibiotics are commonly used both in humans and animals in the treatment of bacterial diseases. Main uses of antibiotics in veterinary medicine include the treatment of identified illnesses, their prophylactic use in the prevention of several diseases, and their use as grow and yield promoters. A negative consequence related with the use of antibiotics in the treatment of bacterial diseases in lactating dairy cows is the possibility of milk contamination after an inadequate use of the drug.

The presence of antibiotic residues in food products is related with undesirable risks in consumers' health, involving direct toxic effects or allergic reactions in sensitized individuals. However, the main consequence related with the presence of antibiotic residues in food products is the appearance and spread of bacterial resistance. In addition to these negative consequences, the presence of antibiotic residues is also of great concern in the dairy industry, since they can affect milk quality and inhibit starter cultures in the production of derivative dairy products, therefore causing important economic losses.

In order to avoid negative consequences to the consumers and dairy industries, related with the presence of antibiotic residues in food products, several control organisms have established limits of residues for different substances, implementing also control schedules within the animal production market. Antibiotic content monitoring, according with established legislations, requires new technology for the precise and *in situ* quantification of residues within different food products, without requiring complex equipment or trained workers.

Therefore, the aim of this work was the design and development of novel electrochemical sensing systems for multidetection and determination of antimicrobial residues belonging to tetracycline, sulfonamide, and β -lactam antibiotics families in milk. Different electrochemical biosensors were implemented for the detection and determination of individual families of antimicrobial residues, as well as multiplexed systems for the simultaneous detection of antimicrobials from different families. As selective bioreceptors, two specific antibodies against sulfonamides and tetracyclines, as well as a recombinant penicillin binding protein for the recognition of β -lactam antibiotics were used in the developed biosensors, all of them based on direct competitive affinity assays.

The developed biosensors were:

- i) A disposable amperometric magnetoimmunosensor for the specific detection and quantification of tetracyclines (TCs) residues in milk, involving the use of a selective antibody immobilized on the surface of Protein G-functionalized magnetic beads (MBs). The magnetoimmunosensor performance including the analytical characteristics for the determination of different TCs and the selectivity against other antibiotics were evaluated. The developed methodology allowed quantification in 30 min with detection limits in the low ppb level in untreated milk samples. A good selectivity against other antibiotic residues that may be detected in milk and dairy products was also observed. The practical usefulness of the

magnetoimmunosensor was proved by analyzing low level-spiked milk samples. It was also shown that the signals obtained upon only 5 min of incubation were still sufficient to distinguish clearly between antibiotic-free milk and milk containing TC at the MRL stated by European legislation. The obtained results demonstrated that the developed disposable magneto-immunosensor offered a broad specificity for the detection of TCs antibiotics residues in milk at the low ppb concentration level.

ii) A disposable amperometric magnetoimmunosensor for the specific detection and quantification of sulfonamides residues in milk. The biosensor involved the use of a selective antibody immobilized on the surface of Protein G-functionalized MBs. The magneto-immunosensor allowed the determination of sulfonamide antibiotics in untreated milk samples in 30 min. A good selectivity against other antibiotic residues frequently detected in milk and dairy products was found. The magnetoimmunosensor was applied to the analysis of UHT whole milk samples spiked with SPY. The obtained results demonstrated that the developed disposable magnetoimmunosensor exhibited a broad specificity for the detection of sulfonamide antibiotics residues in milk at the low ppb concentration level with a rapid and reproducible methodology.

iii) An amperometric affinity disposable magnetosensor involving the use of a recombinant Penicillin Binding Protein (PBP) for the specific detection and quantification of β -lactam antibiotics residues in milk. The PBP was immobilized onto HisTag-MBs. The affinity sensor performance for the determination of different β -lactams as well as the selectivity against other antibiotics were evaluated. The magnetosensor was successfully applied to the analysis of milk samples spiked at low concentration levels after just a dilution sample treatment. Due to the bioreceptor employed, the biosensor was able to detect only the active form of β -lactam antibiotics with high affinities for both penicillins and cephalosporins. The analysis took only 30 min.

iv) A disposable integrated amperometric immunosensor using a selective antibody for the detection and quantification of sulfonamide residues in milk. The immobilization procedure involving a novel strategy through covalent coupling with a 4-aminobenzoic acid modified carbon surface was fully optimized and characterized. The immunosensor performance, including the analytical characteristics for the determination of different sulfonamides, the selectivity against other antibiotics, the influence of different kinds of milk and its dilution, was evaluated. The disposable immunosensor has been successfully applied to the analysis of milk samples. Moreover, the immunosensor was applied to the analysis of mixtures of sulfonamides. It was also shown that the signals measured in only 2.5 min were still sufficient to discriminate between antibiotic-free milk and samples containing SPY at the stated MRL by current European legislation.

v) An affinity biosensor for the specific detection and quantification of β -lactam antibiotics residues in milk, developed after a novel, extremely simple, versatile and fast strategy for the functionalization of carbon electrodes in a single-step with dense layers of chelating agents for the immobilization of a recombinant PBP. The biosensor exhibited a good selectivity against other antibiotics residues frequently detected in milk and dairy products, and allowed the detection of both penicillins and cephalosporins, with a non-hydrolyzed β -lactam ring, in compliance with the established MRLs for these antibiotics. The affinity biosensor was able to analyze untreated milk samples in approximately 30 min with LODs values in the low ppb level.

vi) A novel integrated amperometric dual immunosensor for the simultaneous determination of sulfonamide and tetracycline antibiotics residues in milk, by immobilizing selective antibodies on the surface of Protein G-modified screen-printed dual carbon electrodes. The oriented immobilization of the respective antibodies either using bacterial protein A or G was considered. The developed methodology achieved LODs in the low ppb level for SPY and TC in untreated milk samples in 30 min as well as a good selectivity against other antibiotic residues which can be also detected in milk and dairy products. No significant cross-talk between both working electrodes of the dual immunosensor was observed. The usefulness of the dual immunosensor was demonstrated by analyzing spiked milk samples and a reference milk containing a very low certified OTC content.

vii) An amperometric affinity-magnetosensor to perform the multiplexed detection of cephalosporins, sulfonamides and tetracyclines antibiotics residues. The approach relied on the use of a mixture of three specifically modified MBs. The magnetosensor performance, including the characteristics regarding the individual detection of different antibiotics and antibiotics mixtures, was evaluated. The developed methodology allowed discrimination between uncontaminated UHT and raw milk samples and samples containing antibiotics residues at their MRLs in only 5 minutes. The developed magnetosensor was successfully applied to the detection of antibiotics at low concentration in spiked UHT and raw milk samples with a very simple sample treatment in the case of raw milk in order to get thermal inactivation of the endogenous lactoperoxidase (LPO). The magnetosensor allowed a clear discrimination between antibiotic-free milk and milk samples spiked with antibiotics residues at or above their established MRL.

Moreover, other non-conventional analytical strategies were explored in order to check their suitability to be used for the detection of antibiotics residues in milk:

i) SECM was used for the qualitative and quantitative determination of SPY in milk. After the fabrication of sulfonamide-sensitive immunoplatfoms with selective antibodies immobilized on the surface of Protein G-modified glassy carbon plates, a direct competitive immunoassay was performed by incubating milk sample solutions containing an antibiotic HRP-labeled analog. The obtained immunoplatfoms were interrogated with SECM by means of the sample generator/tip collector mode and in a redox competition mode after the enzyme-catalyzed deposition of silver particles.

ii) A biofuel cell prototype was constructed by using an immunosensor as biocathode and applied to the determination of sulfonamides antibiotic residues in milk. The biocathode was prepared with a graphite rod electrode modified with Protein G for the immobilization of selective antibodies and after performing a direct competitive immunoassay in milk solutions with a fixed content of an HRP-labeled analog of the antibiotic, the ABTS-mediated reduction of H_2O_2 allowed quantification of antibiotic residues. The other half-cell of the developed BFC consisted of a bioanode where cellobiose dehydrogenase was immobilized on a graphite electrode for the biocatalytic oxidation of lactose in milk.

The presented results demonstrated the reliability, accuracy, speed, and selectivity of the biosensors implemented for antimicrobial residues detection. The developed methodologies could be implemented for the assay in commercial milk samples without the need of applying any pretreatment or in raw milk after just a brief heat treatment. The developed biosensors and implemented methodologies proved to be useful and interesting analytical tools for antibiotics detection and determination.

Símbolos y abreviaturas

%RC: porcentaje de reactividad cruzada

4-ABA: ácido 4-aminobenzoico

7-ACA-GOD: ácido 7-aminocefalosporánico modificado con glucosa oxidasa

Å: ångström (10^{-10} m)

Ø: diámetro

β-LMs: antibióticos β-lactámicos

Δ_m: diferencia absoluta entre el valor medio obtenido y el valor certificado

θ: porcentaje de recubrimiento aparente

ρ: densidad

A

Ab: anticuerpo

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

AD/DA: convertidor analógico/digital

AEDT: ácido etilendiaminotetraacético

Ag: antígeno

AMOX: amoxicilina

AMP: ampicilina

ANTA: hidrato de N_{ω} , N_{α} -bis(carboximetil)-L-lisina

antiDIG: anticuerpo selectivo frente a digoxigenina

antiH1: anticuerpo selectivo frente a la molécula orgánica H1

antiHRP: anticuerpo frente a peroxidasa

antiPENG: anticuerpo selectivo frente a PENG

antiSPY: anticuerpo frente a sulfonamidas

antiTC: anticuerpo frente a tetraciclinas

AP: fosfatasa alcalina

AT: alta temperatura

AuE: electrodo de oro

AuNPs: nanopartículas de oro

Au-PAMAM: nanocompuestos de nanopartículas de oro y dendrímero de poliamidoamina

B

B&W: disolución reguladora *Binding and Washing*

BFC: célula de biocombustible

BQ: *p*-benzoquinona

BSA: albúmina de suero bovino

BT: Baja temperatura

C

CAP: cloranfenicol

CBC: carbencilina

cc: concentrado

CCD: dispositivo de carga acoplada

CCT: cefacetrilo

CCα: límite de decisión

CCβ: capacidad de detección

CD: ciclodextrina

CDH: celobiosa deshidrogenasa

CEF: cefapirina

CFC: cefalosporina C

CFL: cefalexina

CFN: cefalonio

CFQ: cefquinoma

CFX: cefalexina

CIP: ciprofloxacina

CLOX: cloxacilina

CPZ: cefoperazona

CRM: material de referencia certificado

CTC: clortetraciclina

CTF: ceftiofur

CV: voltamperometría cíclica

Cys: cisteína

CZL: cefazolina

D

d: distancia a la superficie

DCLOX: dicloxacilina

DHFA: ácido dihidrofólico

DHSTM: dihidroestreptomicina

DIG-AMP: ampicilina marcada con digoxigenina

DMAP: 4-(dimetilamino)piridina

DMC: demeclociclina

DMF: dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DPV: voltamperometría diferencial de impulsos

DXC: doxiciclina

E

E: potencial

E_{ap}: potencial aplicado

EDC: carbodiimida

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EIS: espectroscopía de impedancia electroquímica

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ELRA: ensayo por receptores ligado a enzimas

ENRO: enrofloxacina

ERI: eritromicina

EtOH: etanol

F

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDA: Food and Drug Administration

FI: análisis por inyección en flujo

FIA: fluoroinmunoensayo

FIL: Federación Internacional de Lechería

FLISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a fluoróforos

FQs: fluoroquinolonas

G

G/C: modo generación/recolección de la SECM

GA: glutaraldehído

GC: cromatografía de gases

GCE: electrodo de carbono vitrificado

GENT: gentamicina

GOD: glucosa oxidasa

GOPS: (3-glicidiloxipropil)-trimetoxisilano

H

h: horas

hidrol.: hidrolizado

His: histidina

HisTag-MBs: partículas magnéticas para la captura de proteínas modificadas con un *tag* de histidinas

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

HQ: hidroquinona

HRP: peroxidasa

HS-NTA: *N*-[*N*_α,*N*_α-bis(carboximetil)-L-lisina]-12-mercapto-dodecanamida

I

i: intensidad de corriente

IC₅₀: concentración de analito que ocasiona una disminución del 50 % de la

señal obtenida en ausencia del mismo

ID: intervalo dinámico

Ig: inmunoglobulina

IgG: inmunoglobulina G

IMAC: cromatografía de afinidad metal-ligando

IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranósido

K

K: constante de formación/ constante de afinidad

KAN: kanamicina

kb: kilobase

kDa: kilodalton

L

LAU-NTA: *N*²,*N*²-bis(carboximetil)-*N*⁶-dodecanoil lisina

LB: medio de cultivo Luria-Bertani

LC: cromatografía de líquidos

LD: límite de detección

LMR: límite máximo de residuos

LPO: lactoperoxidasa

M

m-SAM: monocapa autoensamblada mixta

mAb: anticuerpo monoclonal

MBs: partículas magnéticas

Me: metal

MeOH: metanol

MES: ácido 2-morfolinoetano-sulfónico

min: minutos

MIP: polímero de impronta molecular
MNC: minociclina
mRNA: RNA mensajero
MS: espectrometría de masas
MTC: metaciclina
MTI: meticilina
MWCNTs: nanotubos de carbono de pared múltiple

N

n: número de medidas/ número de electrones implicados en una reacción redox
nAg: nanopartículas de plata
NEO: neomicina
NFC: nafcilina
NHS: *N*-hidroxisuccinimida
NTA: ácido nitrilotriacético

O

o/n: durante la noche
OCP: potencial a circuito abierto
OCV: voltaje a circuito abierto
OMS: Organización Mundial de la Salud
OTC: oxitetraciclina
OVA: ovoalbúmina
OXA: oxacilina

P

P&D: disolución reguladora *Pull and Down*
p/v: peso/volumen
p: pendiente de Hill

P017-TB: polímero redox funcionalizado con azul de toluidina
pAb: anticuerpo policlonal
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
PAMAM: poliamidoamina
PBP: proteína fijadora de penicilina
PBS: disolución reguladora de fosfato salino
PBST: disolución reguladora de fosfato salino y Tween®20
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PEG: polietilenglicol
PENG: penicilina G o bencilpenicilina
PENG-HRP: trazador enzimático para β -lactamas
PENV: penicilina V
pK_a: logaritmo negativo de la constante de disociación de un ácido
poliHis: polihistidina
ppb: partes por billón
ppm: partes por millón
prot.: proteína
ProtA: proteína A
ProtA-MBs: partículas magnéticas modificadas con ProtA
ProtG: proteína G
ProtG-MBs: partículas magnéticas modificadas con ProtG
PS: poliestireno
PSTZ: ftalilsulfatiazol
PVC: poli(cloruro de vinilo)

Q

Qdot: puntos cuánticos

R

r: coeficiente de correlación
R39: DD-carboxipeptidasa de *Actinomadura* R39
RC: reactividad cruzada
R_α: resistencia a la transferencia de carga
RIA: radioinmunoensayo
RNA: ácido ribonucleico
rpm: revoluciones por minuto
RSD: desviación estándar relativa

S

s: desviación estándar
SAM: sulfacetamida
SAs: sulfonamidas
SBC: sulbencilina
SCP: sulfacloropiridazina
SDS: dodecilsulfato sódico
SDZ: sulfadiazina
SECM: microscopía electroquímica de barrido
SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SMR: sulfamerazina
SMX: sulfametoxazol
SMZ: sulfametazina
s_n: señal normalizada
SPAuE: electrodo serigrafiado de oro
sPBP3*: forma soluble de PBP 3

SPCE: electrodo serigrafiado de carbono

SPdCE: electrodo serigrafiado dual de carbono

SPE-RC: electrodo serigrafiado con electrodo de trabajo rodinado

SPR: resonancia de plasmón superficial

SPY: sulfapiridina

SPY-HRP: trazador enzimático para sulfonamidas

ssDNA: DNA monocatenario

STM: estreptomina

STZ: sulfatiazol

Sulfo-NHS: *N*-hidroxisulfo-succinimida

SWV: voltamperometría de onda cuadrada

T

t: tiempo

T^a amb.: temperatura ambiente

TB: azul de toluidina

TC: tetraciclina

TC-HRP: trazador enzimático para tetraciclinas

TCs: tetraciclinas

THFA: ácido tetrahidrofólico

TIL: tilosina

TIRF: fluorescencia de reflexión interna total

TMB: 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina

tRNA: RNA de transferencia

Trp: triptófano

Tween®20: polisorbato 20

U

U: unidades de actividad enzimática

UE: Unión Europea

UHT: ultrapasteurizada

UME: ultramicroelectrodo

UV: ultravioleta

u_Δ: incertidumbre combinada

v/v: volumen/volumen

v: velocidad de barrido

V: volumen

var.: variedad

V_{rms}: amplitud de excitación sinusoidal

W

WE: electrodo de trabajo

WIOS: sistema óptico interrogado por longitud de onda

Symbols and Abbreviations

4-ABA: 4-aminobenzoic acid

A

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid)

AMOX: amoxicillin

AMP: ampicillin

B

BFC: biofuel cell

BQ: 1,4-benzoquinone

C

CEF: cefapirin

CLOX: cloxacillin

CTC: chlortetracycline

D

DXC: doxycycline

F

FDA: Food and Drug Administration

G

G/C: generator/collector mode of SECM

H

HisTag-MBs: magnetic beads for the capture of Histidine-tagged proteins

HQ: hydroquinone

HRP: horseradish peroxidase

L

LOD: limit of detection

LPO: lactoperoxidase

M

MBs: magnetic beads

min: minutes

MRL: maximum residue limit

N

n: number of determinations

NTA: nitrilotriacetic acid

O

OTC: oxytetracycline

OXA: oxacillin

P

PBP: penicillin binding protein

PENG: penicillin G

ppb: parts per billion

R

RSD: relative standard deviation

S

SCP: sulfachloropyridazine

SDZ: sulfadiazine

SECM: scanning electrochemical microscopy

SMR: sulfamerazine

SMZ: sulfamethazine

SPCE: screen-printed carbon electrode

SPdCE: screen-printed dual carbon electrode

SPY: sulfapyridine

STZ: sulfathiazol

T

TC: tetracycline

TCs: tetracyclines

U

UHT: ultra-high temperature

Publicaciones derivadas de la presente
Tesis Doctoral

Disposable and integrated amperometric immunosensor for direct determination of sulfonamide antibiotics in milk

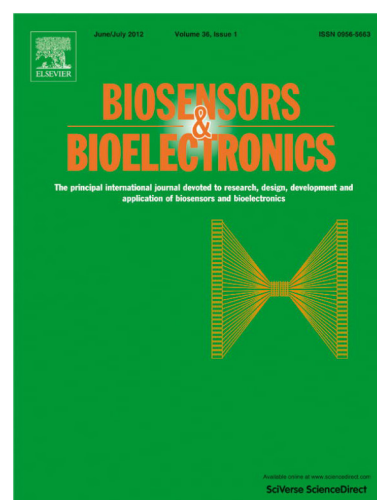
Biosensors and Bioelectronics

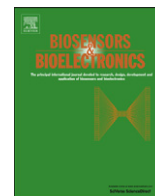
Volumen: 36

Páginas: 81 – 88

Año de publicación: 2012

DOI: 10.1016/j.bios.2012.03.044





Disposable and integrated amperometric immunosensor for direct determination of sulfonamide antibiotics in milk

Felipe Conzuelo^a, María Gamella^a, Susana Campuzano^a, Daniel G. Pinacho^b, A. Julio Reviejo^a, M. Pilar Marco^b, José M. Pingarrón^{a,*}

^a Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Applied Molecular Receptors group (AMRG), IQAC-CSIC, CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 January 2012

Received in revised form

26 March 2012

Accepted 29 March 2012

Available online 7 April 2012

Keywords:

Sulfonamide antibiotics

Integrated immunosensor

Milk

Screen-printed electrodes

ABSTRACT

The preparation and performance of a disposable amperometric immunosensor, based on the use of a selective capture antibody and screen-printed carbon electrodes (SPCEs), for the specific detection and quantification of sulfonamide residues in milk is reported. The antibody was covalently immobilized onto a 4-aminobenzoic acid (4-ABA) film grafted on the disposable electrode, and a direct competitive immunoassay using a tracer with horseradish peroxidase (HRP) for the enzymatic labeling was performed. The amperometric response measured at -0.2 V vs the silver pseudo-reference electrode of the SPCE upon the addition of H_2O_2 in the presence of hydroquinone (HQ) as mediator was used as transduction signal. The developed methodology showed very low limits of detection (in the low ppb level) for 6 sulfonamide antibiotics tested in untreated milk samples, and a good selectivity against other families of antibiotics residues frequently detected in milk and dairy products. These features, together with the short analysis time (30 min), the simplicity, and easy automation and miniaturization of the required instrumentation make the developed methodology a promising alternative in the development of devices for on-site analysis.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Clinical and food-safety areas are in search of new methodologies for a rapid and accurate determination of substances with undesirable health effects. Some of these substances are antibiotics which are active for the treatment of infectious diseases produced by bacteria but they are also used to improve feed efficiency and to promote growth. Residues of antibiotics may enter the food chain either by illegal use or by non-compliance of producers to existing animal-treatment protocols prior to milking treated animals (Zhu et al., 2011). The milk and dairy products industries are among the sectors most affected by the presence of antibiotic residues, not only because of the risk of chemical poisoning, allergic reactions, and the development of mechanisms of bacterial resistance, causing a serious threat to human and animal health, but also because of important economic losses derived by the inhibitory effect of these biocides in the fermentation processes (production of cheese and cultured milk products) (Zacco et al., 2007; Font et al., 2008; Adrian et al., 2009a). Therefore, dairy industry screens incoming milk for the presence of antibiotics to prevent contaminated milk from entering the food chain (Raz et al., 2009).

The use of β -lactams, sulfonamides and tetracyclines is allowed to prevent and treat animal diseases in veterinary medicine (Fernández et al., 2010). Among these, sulfonamides are a wide group of synthetic antibiotics with a broad-spectrum antimicrobial activity and thus widely used (Adrian et al., 2009a). Their chemical structure contains a 4-aminobenzenesulfonamide functionality with different heterocycles attached to the N1-position of the sulfonamide bridge (see Fig. 1) (Font et al., 2008). During the last decades, sulfonamide residues have been detected at significant concentration levels in many biological samples such cows milk (Font et al., 2008).

Because of their carcinogenic effects and in order to ensure consumers safety, an effective control of antibiotic residues in milk and edible tissues is mandatory, and consequently maximum residue limits (MRLs) have been established by regulatory authorities. European Union, Canada and USA regulations have set the MRLs of total sulfonamides of $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (ppb) in milk and edible tissues (Commission Regulation (EEC) No. 675/92, 1992; Font et al., 2008; Centi et al., 2010; Commission Regulation (EU) No. 37/2010, 2009).

Most of the analytical procedures today available for antibiotic determination, such as microbial assays, do not have the necessary detectability to comply with the legislation, are too slow or are specific for one compound not gathering all the common sulfonamides (McGrath et al., 2005; Zacco et al., 2007). Other methods, like standard chromatographic techniques (HPLC and GC) can reach

* Corresponding author. Tel.: +34 913944315; fax: +34 913944329.
E-mail address: pingarro@quim.ucm.es (J.M. Pingarrón).

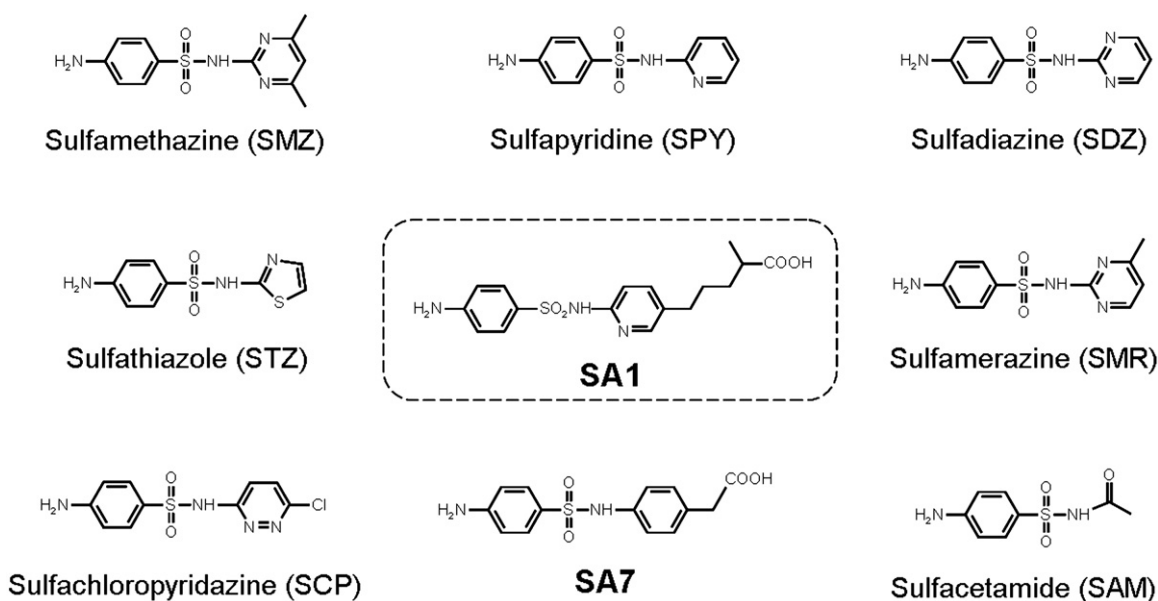


Fig. 1. Chemical structures and abbreviations of the sulfonamides detected. The selected immunizing hapten (SA1) and the hapten used for the preparation of the enzyme tracer (SA7) are also shown.

excellent detectability and specificity but require skilled personnel, sophisticated and expensive equipment, large sample volumes and tedious sample preparation procedures, thereby limiting their use as fast and efficient high-throughput screening methods (Zacco et al., 2007; Font et al., 2008). As a consequence, the development of rapid, inexpensive, sensitive and high sample throughput and on-site analytical strategies which can be used in a wide variety of food matrices and by untrained personnel are required (Zacco et al., 2007). The advantages of electrochemical sensors, like its simplicity, low cost and portability, leads to the development of different approaches with attractive sensing characteristics for its use as alternative analytical methods, providing fast and accurate responses without sample pre-treatment procedures and the possibility of direct *on site* analysis with easy-to-use devices. Electrochemical sensors based on the use of abiotic receptors fabricated by different imprinting approaches have been developed for detection of sulfonamides (Özkorucuklu et al., 2008; Almeida et al., 2011a, b). Although the sensors based on these plastic antibodies are reusable and cost-effective, the detection limits achieved with these molecularly imprinted polymers (MIP) sensors are around three orders of magnitude higher than the ones achieved in this work and cannot comply with the established legislation for milk samples. Moreover, DNA-modified electrodes were also used for sulfonamides determination (Evtugyn et al., 2005). Although in this case the sensitivity is appropriate, the selectivity is a limiting factor since the employed antibiotic-DNA interaction is much less specific than for immunosensors. However, electrochemical immunosensors combining the high selectivity provided by immunological species with the high sensitivity achieved with electrochemical transducers constitute powerful analytical tools with potential relevant usefulness for the determination of antibiotic families (Zacco et al., 2007).

Although electrochemical immunoassays, involving the use of functionalized magnetic beads (MBs) and bare SPCEs to perform the immunoreactions and electrochemical detection, respectively, have been developed recently for the sensitive and selective detection of sulfonamide antibiotics in honey (Centi et al., 2010) and milk samples (Zacco et al., 2007; Font et al., 2008), to our knowledge there is no report about the development of any integrated electrochemical immunosensor, in which the bio-receptor is immobilized on the electrode surface, for the determination of this antibiotic family.

The present paper describes, for the first time, the development of a disposable and integrated amperometric immunosensor with a broad specificity for the detection of sulfonamide antibiotic residues in milk at the low ppb concentration level as a rapid method which may be applied for on-site food quality control. The sensor is based on a novel antibody immobilization procedure *via* covalent coupling with a 4-aminobenzoic acid (4-ABA) modified carbon surface. Quantification is achieved through competitive binding between sample sulfonamide antibiotic and a HRP-labeled specific tracer for binding sites of the capture antibodies immobilized on the working electrode surface. The electrochemical detection of the enzyme product is carried out at a disposable screen-printed carbon electrode (SPCE), using HQ as electron transfer mediator and H₂O₂ as the enzyme substrate. The immunosensor performance, including the analytical characteristics for the determination of different sulfonamides and the selectivity against other families of antibiotics are evaluated. Finally, the disposable immunosensor has been successfully applied to the analysis of low level spiked milk samples after just simple dilution treatment.

The present paper describes, for the first time, the development of a disposable and integrated amperometric immunosensor with a broad specificity for the detection of sulfonamide antibiotic residues in milk at the low ppb concentration level as a rapid method which may be applied for on-site food quality control. On the contrary to the works of Zacco et al. (2007) and Centi et al. (2010), all the steps involved with the functioning of this integrated immunosensor are performed on the surface of the modified SPCE, which simplifies largely the analytical methodology as well as the possible integration in a lab-on-a chip device to carry out the quality control in the milk intake process at the field or farm, or even in the dairy tankers that arrived to the dairy industries.

2. Materials and methods

2.1. Apparatus and electrodes

Voltammetric and amperometric measurements were performed with a CHI812B bi-potentiostat (CH Instruments, Inc., USA) controlled by software CHI812B. All measurements were

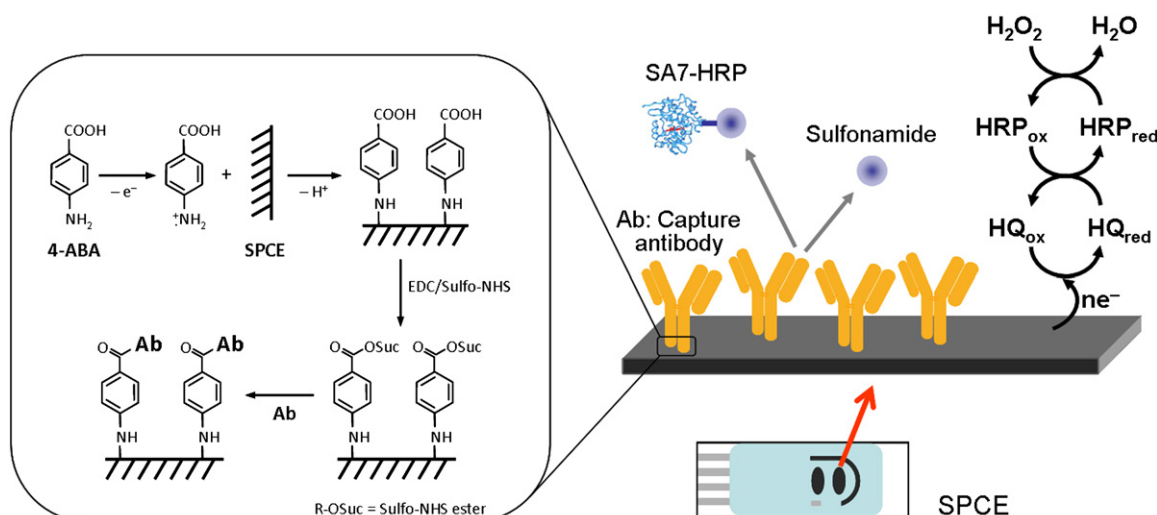


Fig. 2. Schematic display of the developed sulfonamide antibiotics immunosensor. Left inset: details of the surface chemistry involved on the covalent immobilization of the capture antibody by using EDC and Sulfo-NHS 4-ABA film formed on a SPCE.

carried out at room temperature. Impedance measurements were accomplished using a Voltalab PGZ 402 equipment.

The transducers employed were dual screen-printed carbon electrodes (SPCEs) (DRP-C1110, DropSens) consisting of two elliptic carbon working electrodes, a carbon counter electrode and an Ag pseudoreference electrode (see Fig. 2).

For homogenization of the fortified samples a Bunsen AGT-9 Vortex was used.

2.2. Reagents and solutions

All the reagents used were of the highest available grade. 4-Aminobenzoic acid (4-ABA) was purchased from Acros Organics. LiClO_4 , Tween[®]20, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC), *N*-hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS), $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, horseshoe crab hemocyanin (HCH), horseradish peroxidase (HRP), casein, hydroquinone (HQ), hydrogen peroxide (30%, w/v), sulfamethazine (SMZ), sulfadiazine (SDZ), sulfamerazine sodium salt (SMR), sulfachloropyridazine (SCP), sulfathiazole sodium salt (STZ), sulfacetamide sodium salt (SAM) and tetracycline hydrochloride (TET) were purchased from Sigma-Aldrich. Sulfapyridine (SPY), penicillin G sodium salt (PENG), cefapirin (CEF) and enrofloxacin (ENRO) were from Fluka. 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) was acquired from GERBU Biotechnik, GmbH. Ethanol, sodium dihydrogen phosphate, di-sodium hydrogen phosphate, potassium chloride, sodium chloride and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Scharlau. Stock solutions (10 mM) of different antibiotics were prepared in DMSO (SPY, SMZ, SDZ, SCP, CEF and ENRO) or in PBST (SMR, STZ, SAM, TET and PENG) and kept at 4 °C. Antibiotic standard solutions for immunosensor calibration purposes were prepared daily upon dilution of the stock solutions in PBST or in the diluted milk matrix.

Details about the preparation of polyclonal antiserum (As167) used can be found in the Supporting Information.

For the COOH functionalization of the SPCE, an anhydrous ethanol solution containing 3 mM 4-ABA and 0.1 M LiClO_4 was used (Liu et al., 2000).

For the activation of the 4-ABA film grafted on the SPCE, an EDC/Sulfo-NHS mixture solution (100 mM each in MES buffer pH 6.0) was used.

All buffer solutions were prepared with Milli-Q water (18 M Ω cm at 25 °C). MES buffer is 0.05 M MES, pH 6.0. Phosphate-buffered

saline (PBS) is 0.01 M phosphate buffer solution containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl, pH 7.5. PBST is PBS with 0.05% Tween[®]20.

UHT milk samples (whole, semi-skimmed and skimmed) and one whole pasteurized milk sample were purchased in a local supermarket, spiked, and used directly for the determination or after dilution with PBST.

For the matrix effect studies, SPY standard curves were prepared in different milk samples diluted with PBST in different proportions.

2.3. Immunosensor preparation and immunoassay procedure

Detailed descriptions of the immunosensor preparation and the immunoassay procedure are reported in the Supporting information.

2.4. Electrochemical measurements

Impedimetric and cyclic voltammetric measurements were carried out after deposition on the modified electrode surface of 50 μL of a $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mM in each component, solution in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0. Electrochemical impedance measurements were performed at the equilibrium potential of the $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ pair, with a 10 mV (rms) sinusoidal excitation amplitude, and an automatic analyzer integration time (0.001% S.D. of $I(j\omega)$ correlator output) with a 100 s cut-off time. Measurements were made at 20 steps per decade in the appropriate frequency range five times at each frequency and averaged during each run.

Cyclic voltammograms were recorded from -0.4 to 0.6 V at a scan rate of 50 mV s^{-1} . All the experiments were carried out at room temperature.

Amperometric measurements in stirred solutions were performed by applying the desired potential and allowing the steady-state current to be reached. The immunosensors were transferred to an electrochemical cell containing 10 mL of a 0.1 M phosphate buffer pH 6.0 containing 1.0 mM HQ (prepared daily just before the electrochemical measurement) and the amperometric responses ($E_{\text{app}} = -0.20$ V vs Ag pseudoreference electrode) to the addition of 50 μL of a 0.1 M hydrogen peroxide solution were recorded until the steady-state current was reached (approx. 1 min).

2.5. Selectivity studies

Cross-reactivity studies were carried out by measuring the competitive curves for other chemically related and nonrelated antibiotics under the optimized conditions in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk samples.

2.6. Milk analysis

Commercial milk samples (undiluted or after dilution in PBST) were fortified with the appropriate concentration of the enzymatic tracer and the antibiotic following the protocol described in Section “Immunoassay procedure” in the Supporting Information. Aliquots (50 μL) of the milk samples were analyzed following the methodology described in Section “Immunoassay procedure” in the Supporting information for standard solutions but omitting the previous blocking step with the 0.2% casein solution (not advantageous for the analysis in the milk matrices). Unspiked samples were also checked to exclude the presence of naturally contaminating antibiotics.

3. Results and discussion

Since sulfonamide antibiotics are low molecular weight molecules, containing only one antigen determinant, a competitive immunoassay format was performed (Zacco et al., 2007). In the competitive scheme employed in this work the sulfonamide antibiotics competed with a fixed concentration of the enzymatic tracer (SA7-HRP) for the limited number of the antigen binding sites of the capture antibodies covalently immobilized on the carbon electrode surface (see Fig. 2). This immobilization was accomplished through a 4-ABA film grafted on the working electrode surface as described in Section “Immunosensor preparation” in the Supporting Information and depicted in Fig. 2, where it can be observed as the grafting procedure employed involved the electrochemical oxidation of the amino group to its cation radical (Liu et al., 2000). It is worth to mention here that this is the first time that a SPCE surface was modified through free radical grafting and it is also the first example in which an antibody (instead of an enzyme or oligonucleotide) was covalently immobilized on a 4-ABA film.

3.1. Optimization of the experimental variables

Firstly, the successful grafting of the 4-ABA film and the subsequent immobilization of the capture antibody on the disposable electrode surface were evaluated by monitoring the stepwise assembly using cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). Fig. 3 shows the CVs for the $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ redox pair recorded at a bare SPCE, a 4-ABA-modified SPCE, a modified SPCE after activation with EDC/Sulfo-NHS and upon immobilization of the capture antibody. The inset in Fig. 3 shows the corresponding Nyquist plots recorded by EIE. As expected, electrode modification with the 4-ABA film produced a decrease in the peak current and an increase in the separation of peak potentials compared to the voltammetric behavior at the unmodified electrode. The increase in the peak current observed after the activation of the 4-ABA film can be explained by the neutralization of the negative charge of the surface confined $-\text{COOH}$ groups after the reaction with EDC/Sulfo-NHS. The immobilization of the capture antibody produced an additional barrier for the access of the redox probe to the electrode thus leading to a further decrease in the voltammetric signal. These results are consistent with the changes observed in the electron transfer resistance measured by EIS (see Fig. 3 inset). The unusual shape of the Nyquist plot observed after Ab immobilization can be

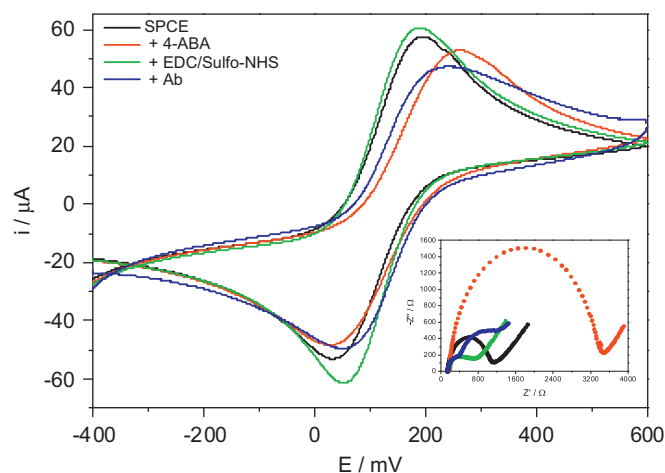


Fig. 3. Cyclic voltammograms and the corresponding Nyquist plots ($-Z''$ vs Z') for the faradaic impedance measurements (inset) obtained with a bare SPCE, 4-ABA-SPCE, EDC/Sulfo-NHS-4-ABA-SPCE and Ab-EDC/Sulfo-NHS-4-ABA-SPCE in a 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 solution containing 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1). EIE parameters: 0.01–10,000 Hz frequency range with a 0.01 V rms signal at +0.25 V (vs Ag pseudoreference electrode); CV, $\nu=50 \text{ mV s}^{-1}$.

attributed to the existence of two different layers on the Ab-4-ABA-SPCE: activated 4-ABA monolayer with and without attached antibody (Rahman et al., 2008; Rodríguez et al., 2008). Moreover, the CVs on 4-ABA-modified SPCE under different pH conditions agree perfectly with the pK_a value reported for 4-ABA in solution ($\text{pK}_a=4.6$) (Fig. S-1 in the Supporting information) (Brill, 1921; Liu et al., 2000).

To evaluate the existence of non-specific binding of the enzymatic tracer on the electrode surface we compared the response obtained at activated monolayer-modified electrodes with and without (blank-electrode) immobilizing the capture antibody and upon incubation in a solution of the enzymatic tracer. The blank-electrode response should measure the extent of the background current and current arising from the non-specific binding of the enzymatic conjugate to the working electrode surface, whereas the capture antibody–electrode response should include the specific conjugate–capture antibody binding.

BSA, casein and milk were evaluated as blocking agents to minimize non-specific binding events. The obtained results (see Fig. S-2 in the Supporting information) showed that the largest ratio between the specific and nonspecific signal was obtained by blocking with a solution of 0.2% casein in PBST. Accordingly, a previous blocking step with such solution for 10 min was used to reduce unspecific binding and to establish the analytical characteristics of the immunosensor in buffer solutions. Nevertheless, under these conditions, the nonspecific signal was still a 50% of the maximum signal measured without SPY.

All the experimental variables involved in the immunosensor functioning were optimized by taking as the selection criteria the maximum current measured at -0.20 V (with the obvious exception of the applied potential value optimization) in the absence of sulfonamide antibiotic. Table S-1 in the Supporting Information summarizes the ranges evaluated for the different variables involved as well as the selected values.

3.2. Analytical characteristics of the developed immunosensor

Although as it will be demonstrated below the capture antibody used has a broad specificity for the sulfonamide antibiotics we have used the SPY as model compound to evaluate the stability and performance of the developed immunosensor in buffered solutions.

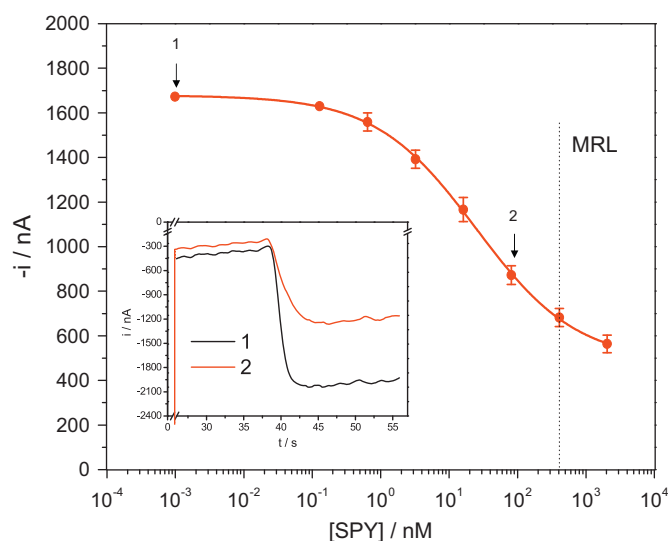


Fig. 4. Calibration curve obtained with the developed immunosensor for SPY in PBST buffer. Inset: amperometric responses obtained at the concentrations indicated with arrows in the calibration graph. The experimental points have been fitted to equation 1 (in the Supporting information). Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$).

The calibration graph for SPY in PBST obtained under the optimized conditions is displayed in Fig. 4, showing the expected shape for a competitive format with a dynamic range (DR) between 0.6 and 64.2 ng mL⁻¹. The IC₅₀ value corresponded to 6.13 ng mL⁻¹ and the LOD was 0.15 ng mL⁻¹. It is interesting to remark that this LOD value is approximately 600 times lower than the limits fixed by the European legislation (100 ppb of total sulfonamide content in edible samples). Therefore, the obtained results are promising and encouraging for the further application of the electrochemical immunosensor in food samples such as milk.

3.3. Application to the analysis of spiked milk samples

The applicability of the developed immunosensor to the analysis of milk samples was initially evaluated by checking the potential matrix effect on the parameters obtained for the SPY calibration curve. For this purpose, SPY spiked milk samples were directly analyzed (without any previous pre-treatment) and measured undiluted or after performing different dilutions with the assay buffer. It is important to point out that no blocking step of the electrode surface with casein was accomplished in the analysis of the milk samples as the own matrix minimized non specific binding of the enzymatic tracer as it will be discussed below.

Firstly, the same procedure was applied to different kinds of 1:1 diluted UHT milk samples (whole, semi-skimmed, and skimmed) and whole pasteurized samples to assess the suitability of the developed strategy to analyze any type of milk. As can be observed in Fig. S-3a (in the Supporting Information), similar calibration curves were obtained for the four milk samples, thus demonstrating that the immunosensor response did not show significant differences depending on the type of milk used. These results pointed to the possibility of using representative milk as a reference material to build a standard calibration curve for subsequent milk measurements (Adrian et al., 2009a). It is important to remark that under these conditions the non-specific signal measured at the blank electrode was around 30% of the maximum signal measured without SPY. Fig. S-3b (in the Supporting Information) compares the calibration graphs recorded for SPY spiked UHT whole samples upon different dilution factors with PBST. As can be observed, as the dilution factor increased the calibration curve moved up along the

y-axis approaching to the curve obtained in PBST. This effect can be attributed both to the higher contribution of the non-specific signals of the enzymatic tracer and to a decrease in the non-specific interference of milk in the antibody–enzyme tracer binding as the dilution factor increased. Table S-2 in the Supporting Information summarizes the IC₅₀, LOD and DR values obtained for the detection of SPY in all the milk samples tested. As it can be seen, the performance of the immunosensor is very attractive in all the milk samples tested allowing limits of detection below 1 ng mL⁻¹ to be achieved in all cases, thus demonstrating the suitability of the developed immunosensor to be applied for the analysis of any kind of milk according to the EC legislation. In particular, the determination of SPY in undiluted UHT whole milk can be performed with a LOD value of 0.20 ng mL⁻¹.

As it is mentioned above, to carry out the competitive assay in milk samples (instead of PBST) implied that the previous blocking step with casein did not represent any improvement in the analytical performance of the immunosensor. This is most likely due to the effective in situ blocking of the free electrode surface by virtue of the milk components (proteins, sugars and fats) present during the incubation step (Setford et al., 1999).

The reproducibility of the responses obtained with different immunosensors was evaluated both within and between days by performing measurements in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk samples in the absence of SPY. Results for 6 different immunosensors prepared in the same day yielded a RSD value of 3.2% for the amperometric responses obtained. Moreover, a RSD value of 5.3% was obtained when 4 immunosensors were prepared and employed in different days. These results demonstrated that the immunosensor fabrication procedure was reliable, and that reproducible amperometric responses can be obtained with different immunosensors constructed in the same manner.

The usefulness of the amperometric immunosensor for the analysis of real samples was evaluated by analyzing 1:1 diluted UHT full cream milk samples (antibiotic-free) spiked with SPY at a 35 nM (8.7 ng mL⁻¹) concentration level.

Considering the matrix effect commented above, the determination of SPY was accomplished by interpolation of the measured current values into the calibration plot constructed for the antibiotic in the same matrix sample. The analysis of ten milk samples yielded an SPY mean concentration of (36 ± 1) nM or (8.9 ± 0.3) ng mL⁻¹ with a mean recovery of (103 ± 3) %, the confidence interval being calculated for $\alpha=0.05$. Taking into account the type of analysis carried out and the straightforwardness of the experimental protocol, this can be considered as a very good result, demonstrating the usefulness of the disposable immunosensor for the determination of very low sulfonamide concentrations in milk samples without sample treatment, in a total time for the assay of approximately 30 min (once the immunosensor is prepared).

Moreover, recovery studies of SPY in milk samples spiked with mixtures of SPY at the 35 nM concentration and two representative antibiotics of other families (PENG and TET) at the same concentration level or at a 10-fold excess, were also carried out. Mean recoveries of (105 ± 8) % and (105 ± 6) % were obtained for 3 samples spiked with mixtures of SPY:PENG:TET (1:1:1) and (1:10:10), respectively. These results confirmed the selectivity of the employed methodology to detect the target family of antibiotics even in the presence of a high excess of non-target antibiotics.

3.4. Immunosensor response towards different sulfonamides

The cross-reactivity of the developed immunosensor was tested for a pool of the most employed sulfonamides and against 4 non-target antibiotics frequently present in milk and dairy products. These studies were performed by preparing calibration curves for all the antibiotics in 1:1 diluted UHT whole milk samples (Fig. 5a).

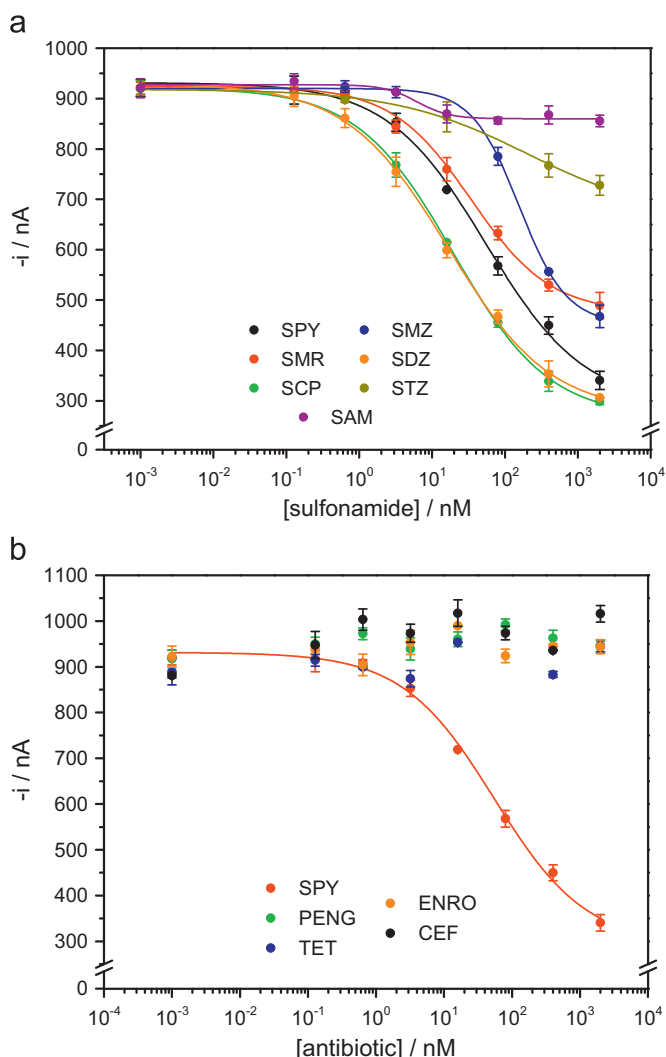


Fig. 5. Calibration graphs obtained with the immunosensor in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk samples for (a) different sulfonamide antibiotics (SPY, SMR, STZ, SMZ, SAM, SDZ and SCP) and (b) 4 non-target antibiotics (TET, PENG, CEF and ENRO, for comparison purposes SPY calibration curve is also shown). Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$).

As can be observed, most of the sulfonamides tested (SMR, SMZ, SDZ and SCP) were highly recognized by the immunosensor, with LOD values ranging between 0.12 and 8.41 ng mL⁻¹, far below the MRLs set by the EC (see Table S-3 in the Supporting Information). However, a remarkably worse recognition was observed for STZ and no competition was observed with SAM. Moreover, Fig. 5b shows clearly that no cross-reactivity occurred for the 4 non-target antibiotics (PENG, ENRO, TET and CEF).

These selectivity results demonstrated clearly the remarkable group specificity of the capture antibody used to prepare the integrated immunosensor.

In order to check the ability of the immunosensor in the detection of total sulfonamides in mixtures of them, we compared the amperometric responses obtained in milk samples spiked with SPY at different concentration levels with those measured for samples spiked with a mixture of 6 different sulfonamides at the same total concentration. Fig. S-4 in the Supporting information shows as only small differences between the measured currents were observed for both kinds of samples due to the different cross-reactivity achieved for each sulfonamide. Nevertheless, these results clearly support the ability of the immunosensor to be employed for detecting total sulfonamides contamination in milk.

3.5. Comparison with other immunosensors and immunoassays reported in the literature

The performance of the amperometric immunosensor developed was compared with that reported for other sulfonamide antibiotics sensors and immunoassay methods reported in the literature. As can be seen in Table 1, only 8 of the reported methodologies were applied to the determination of these antibiotics in milk samples and, among them, only one (Zacco et al., 2007) used electrochemical transduction. It should be also mentioned that, with the exception of the work of Knecht et al. (2004), all the described methodologies required a large dilution of the milk samples to perform the determination. Despite working with less diluted milk samples, the limit of detection achieved in this work for SPY is similar than that reported by Zacco using an electrochemical immunosensor involving modified magnetic beads (Zacco et al., 2007). Moreover, the integrated electrochemical immunosensor developed exhibits the widest DR for the determination of SPY in these complex matrices.

Another critical point, the time required to perform the analysis, is similar to those reported for most of the previous methodologies available for detection in milk.

In order to evaluate the possibility of reducing the assay time, we compared the amperometric signals obtained for 1:1 diluted milk samples spiked with different SPY concentrations for different incubation times with the immunosensor. As can be seen in Fig. S-5 in the Supporting Information, although the magnitude of the measured signal is smaller using shorter incubation times, the signal decrease observed is still enough to obtain a reliable positive result for a sample containing sulfonamide residues above a certain level.

Taking into account the ability to distinguish clearly antibiotic-free milk from milk containing 50 ng mL⁻¹ SPY, the shorter assay (performed in only 2.5 min) would be useful as a quick method for alarm or screening purposes to classify the samples according to the current legislation.

Apart from this comparison with other immunosensors and immunoassays, the performance of the developed immunosensor can be also advantageously compared with the electrochemical sensors involving the use of artificial antibodies mentioned in the Introduction section. Although the cost and reusability of these MIP sensors are probably better than those of the integrated immunosensor (which is, in fact, a disposable sensor), analytical characteristics are significantly improved with the immunosensor so that the requirements of the current legislation can be accomplished.

4. Conclusions

This work describes the first disposable and integrated amperometric immunosensor for the specific and sensitive detection of sulfonamide antibiotics in milk samples. The immunosensor preparation involves the covalent immobilization of a specific capture antibody on a 4-ABA modified SPCE and a direct competitive format.

The described results demonstrate the broad specificity of this immunosensor and its ability to detect and quantify low levels of sulfonamide antibiotic residues reliably, specifically and rapidly in all kind of milk samples without any complex pre-treatment (just a dilution with the assay buffer). The LODs achieved, lower than 1 ng mL⁻¹, are two orders of magnitude lower than the maximum total sulfonamides level allowed.

The great exhibited performance, together with the use of disposable mass-produced sensors, makes the developed immunosensing platform an interesting, useful and affordable alternative to

Table 1
Comparison of the analytical characteristics of the developed immunosensor with other reported immunosensors and immunoassays for the determination of sulfonamides.

Immobilization method	Measurement type	IC ₅₀ /ppb	DR/ppb	LOD/ppb	Sample	Assay time	Reference
SDZ-GOx conjugate immobilized on glass slides with GOPS	Chemiluminescence measurement with a CCD camera of automated chip-based ELISAs	7.7 (SDZ) 11.1 (SMZ)	3.49–43.5 (SDZ) 4.93–63.0 (SMZ)	–	Spiked Pasteurized whole milk (undiluted)	Microarray preparation: 16 h Assay time: ~3 min	Knecht et al. (2004)
Ab covalently immobilized on tosyl-activated MBs	(a) Electrochemical magnetosensing strategy (Amperometry) (b) Magneto-ELISA immunosensing strategy (Optical detection)	(a) 6.37 (SPV) (b) 9.8 (SPV)	(a) 1.05–43.76 (SPV) (b) 0.74–46.22 (SPV)	(a) 0.36 (SPV) (b) 0.23 (SPV)	Whole raw milk diluted 4 times	Ab-modified MBs: 72 h (a) Assay time: 30 min (b) Assay time: 60 min	Zacco et al. (2007)
A lateral flow immunoassay strip OVA-conjugated sulfonamide (SA2-OVA) covalently immobilized on a IDEA	Optical detection	10.78 (SMM) 5.6 (SPV)	–	5 (SMM) –	Swine urine Buffer	8–10 min SA2-OVA-modified IDEAs: ~41 h Assay time: 30 min	Zhang et al. (2008) Bratov et al. (2008)
(a) Ab immobilized on microtiter plates	Direct ELISA	(a) 4.6 (SPV)	–	(a) 0.22 (SPV)	Buffer	(a) Ab-modified microtiter plates: overnight (b) Ab-modified MBs: 135 min Assay time: 60	Font et al. (2008)
(b) Ab covalently immobilized on MBs	(Optical detection)	(b) 6.3 (SPV)	–	(b) 0.38 (SPV)	–	–	–
Imaging surface plasmon resonance-based immunosensor	Optical detection	10.1 (SMZ)	–	–	Milk (diluted by a factor of 10 and filtered)	16 min Sensor chip preparation: 70 min	Raz et al. (2009)
OVA-conjugated sulfonamide (SA2-OVA) immobilized on microtiter plate	Indirect ELISA (Optical detection)	14.3 (SPV)	2.10–96.0 (SPV)	0.65 (SPV)	Whole milk diluted 5 times	SA2-OVA-modified microtiter plates: overnight Assay time: 90 Assay time: 20 min	Adrian et al. (2009a) Adrian et al. (2009b), Adrian et al. (2009c)
OVA-conjugated sulfonamide (SA2-OVA) covalently immobilized with a photopolymerizable dextran layer on a waveguide chip	Fluorescence detection	–	0.4–24 (STZ)	0.11 (STZ)	Water and Honey	18 min	Jomet et al. (2010)
A competitive immunocomplex capture format making use of an immobilized protein A/G sorbent	DPV	–	–	0.016 (SPV)	Buffer	Ab-modified MBs: 45 min Assay time: 30 min	Centi et al. (2010)
Ab immobilized on Protein A-MBs	SPR immunosensor	2.03 (SPV)	–	0.43 (SPV)	Whole milk diluted 5 times	SA2-BSA-modified SPR chips: ~12 h Assay time: 30 min	Fernández et al. (2010)
BSA-conjugated sulfonamide (SA2-BSA) covalently immobilized to a m-SAM on SPR gold chips	Chemiluminescence immunoassay	420.5 (SDZ) 213.5 (SMZ)	22–1575 (SDZ) 34–730 (SMZ)	192.6 (SDZ) 81.5 (SMZ)	Honey	8 min Microarray preparation: 46 h and 20 min	Wutz et al. (2011)
An indirect competitive format using monoclonal antibodies bound to the surface of the microarray	Indirect FLISA	1.58 (SDZ)	–	0.17 (SDZ)	Milk samples diluted 1–5 times	Microtiter plate preparation: 3 h Assay time: 60 min	Zhu et al. (2011)
Antigen immobilized on microtiter plates	Amperometry	13.63 (SPV) 4.32 (SPV)* 4.20 (SDZ)	1.6–118.6 (SPV) 1.2–102.1 (SPV)* 0.5–39.0 (SDZ)	0.44 (SPV) 0.27 (SPV)* 0.12 (SDZ)	Whole milk samples diluted 2 times *Undiluted whole milk samples	Immunosensor preparation: 130 min Assay time: 30 min	This work

Abbreviations: Ab, antibody; BSA, bovine serum albumin; CCD, charge-coupled device; DPV, differential pulse voltammetry; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FLISA, fluorescence-linked immunosorbent assay; IDEAs, interdigitated electrode array; GOPS, 3-(glycidioxypropyl)trimethoxysilane; GOx, glucose oxidase; MBs, magnetic beads; m-SAM, mixed self assembled monolayer; OVA, ovalbumin; SMM, sulfamonomethoxine; SPCE, screen-printed carbon electrode; WIOS, wavelength-interrogated optical system.

*Results achieved in undiluted whole milk samples.

classical assays for the detection of sulfonamide antibiotics. Moreover, the simplicity, and easy automation and miniaturization of the required instrumentation pave the way to the development of an alternative screening assay, usable by untrained personnel, for routinely food safety, inspection control or alarm situations on remote sites, such as field and dairies.

Acknowledgments

The financial support of the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación Research Project CTQ2009-09351BQU, and the AVANSENS Program from the Comunidad de Madrid (S2009PPQ-1642) are gratefully acknowledged. Felipe Conzuelo acknowledges a FPU fellowship from the Spanish Ministry of Education. This work was performed in the frame of European project Confidence (KBBE2007-211326).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.03.044>.

References

- Adrian, J., Font, H., Diserens, J.-M., Sánchez-Baeza, F., Marco, M.-P., 2009a. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 385–394.
- Adrian, J., Pasche, S., Pinacho, D.G., Font, H., Diserens, J.-M., Sánchez-Baeza, F., Granier, B., Voirin, G., Marco, M.-P., 2009b. *Trends in Analytical Chemistry* 28, 769–777.
- Adrian, J., Pasche, S., Diserens, J.-M., Sánchez-Baeza, F., Gao, H., Marco, M.-P., Voirin, G., 2009c. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 3340–3346.
- Almeida, S.A.A., Arasa, E., Puyol, M., Martínez-Cisneros, C.S., Alonso-Chamarro, J., Montenegro, M.C.B.S.M., Sales, M.G.F., 2011a. *Biosensors and Bioelectronics* 30, 197–203.
- Almeida, S.A.A., Moreira, F.T.C., Heitor, A.M., Montenegro, M.C.B.S.M., Aguilar, G.G., Sales, M.G.F., 2011b. *Materials Science and Engineering C* 31, 1784–1790.
- Bratov, A., Ramón-Azcón, J., Abramova, N., Merlos, A., Adrian, J., Sánchez-Baeza, F., Marco, M.-P., Domínguez, C., 2008. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 729–735.
- Brill, H.C., 1921. *Journal of the American Chemical Society* 43, 1320–1323.
- Centi, S., Stoica, A.I., Laschi, S., Mascini, M., 2010. *Electroanalysis* 22, 1881–1888.
- Commission Regulation (EEC) No. 675/92, 1992. *Official Journal of the European Community* L73/8 of 19 march 1992.
- Commission Regulation (EU) No. 37/2010, 2009. *Official Journal of the European Union* L 15/1 of 22 December 2009.
- Evtugyn, G.A., Goldfarb, O.E., Budnikov, H.C., Ivanov, A.N., Vinter, V.G., 2005. *Sensors* 5, 364–376.
- Fernández, F., Hegnerová, K., Pilarik, M., Sánchez-Baeza, F., Homola, J., Marco, M.-P., 2010. *Biosensors and Bioelectronics* 26, 1231–1238.
- Font, H., Adrian, J., Galve, R., Estévez, M.-C., Castellari, M., Gratacós-Cubarsí, M., Sánchez-Baeza, F., Marco, M.-P., 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 736–743.
- Jornet, D., González-Martínez, M.A., Puchades, R., Maquieira, A., 2010. *Talanta* 81, 1585–1592.
- Knecht, B.G., Strasser, A., Dietrich, R., Märtilbauer, E., Niessner, R., Weller, M.G., 2004. *Analytical Chemistry* 76, 646–654.
- Liu, J., Cheng, L., Liu, B., Dong, S., 2000. *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids* 16, 7471–7476.
- McGrath, T., Baxter, A., Ferguson, J., Haughey, S., Bjurling, P., 2005. *Analytica Chimica Acta* 529, 123–127.
- Özkorucuklu, S.P., Şahin, Y., Alsancak, G., 2008. *Sensors* 8, 8463–8478.
- Rahman, M.A., Noh, H.-B., Shim, Y.-B., 2008. *Analytical Chemistry* 80, 8020–8027.
- Raz, S.R., Bremer, M.G.E.G., Haasnoot, W., Norde, W., 2009. *Analytical Chemistry* 81, 7743–7749.
- Rodríguez, A., Valera, E., Ramón-Azcón, J., Sanchez, F.-J., Marco, M.-P., Castañer, L.M., 2008. *Sensors and Actuators, B* 129, 921–928.
- Setford, S.J., Van Es, R.M., Blankwater, Y.J., Kröger, S., 1999. *Analytica Chimica Acta* 398, 13–22.
- Wutz, K., Niessner, R., Seidel, M., 2011. *Microchimica Acta* 173, 1–9.
- Zacco, E., Adrian, J., Galve, R., Marco, M.-P., Alegret, S., Pividori, M.I., 2007. *Biosensors and Bioelectronics* 22, 2184–2191.
- Zhang, G., Wang, X., Zhi, A., Bao, Y., Yang, Y., Qu, M., Luo, J., Li, Q., Guo, J., Wang, Z., Yang, J., Xing, G., Chai, S., Shi, T., Liu, Q., 2008. *Food Additives and Contaminants* 25, 413–423.
- Zhu, K., Li, J., Wang, Z., Jiang, H., Beier, R.C., Xu, F., Shen, J., Ding, S., 2011. *Biosensors and Bioelectronics* 26, 2716–2719.

SUPPORTING INFORMATION

Disposable and integrated Amperometric Immunosensor for Direct Determination of Sulfonamide Antibiotics in Milk

Felipe Conzuelo^a, María Gamella^a, Susana Campuzano^a, Daniel G. Pinacho^b, A. Julio Reviejo^a, M. Pilar Marco^b, José M. Pingarrón^{a,*}

^a*Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain. E-mail: pingarro@quim.ucm.es. Phone number: +34 913944315. Fax number: +34 913944329*

^b*Applied Molecular Receptors group (AMRg), IQAC-CSIC, CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Jordi Girona 18 – 26, 08034 Barcelona, Spain.*

SUPPORTING INFORMATION

CONTENTS	PAGE
Preparation of polyclonal antiserum	S2
Immunosensor preparation	S2
Immunoassay procedure	S3
Fig. S-1	S5
Fig. S-2	S5
Table S-1	S6
Fig. S-3	S7
Table S-2	S8
Table S-3	S9
Fig. S-4	S10
Fig. S-5	S11
References	S11

Preparation of polyclonal antiserum

Preparation of polyclonal antiserum (As167) is described elsewhere (Adrian et al., 2009^a).

Briefly, three female white New Zealand rabbits were immunized using HCH covalently linked to the hapten SA1 (see Fig. 1 in the manuscript). The antiserum was purified by precipitation with ammonium sulfate. Briefly, a saturated solution of ammonium sulfate was added dropwise at 4 °C to 1.8 mL of serum to obtain a 35% saturated solution. After 4 h under constant stirring at 4 °C, the antibodies were precipitated and the supernatant was separated from the solid by centrifugation (10 min, 10,000 rpm). The pellet was re-suspended with 0.9 mL of PBS and dialyzed against PBS 0.5 mM (4×5 L) and Milli-Q water (1×5 L), and subsequently lyophilized. The solid was dissolved in PBS in order to obtain a 1.0 mg mL^{-1} solution. The enzyme tracer (SA7-HRP) (see Fig. 1 in the manuscript) was prepared by covalently coupling the hapten SA7 to HRP using the active ester method (Font et al., 2008).

Immunosensor preparation

Antibodies were covalently immobilized on the electrode surface. First, a film of 4-aminobenzoic acid (4-ABA) was grafted onto the carbon working electrode surface by amine cation radical formation (see Fig. 2 in the manuscript) (Liu et al., 2000). Briefly, the electrochemical modification was performed by immersing the SPCE in the 4-ABA solution described in Section 2.2 of the manuscript and recording 3 cyclic voltammograms ($v=10 \text{ mV s}^{-1}$) between 0.0 and 1.0 V (*vs* Ag pseudoreference electrode). In order to covalently coupling the antibodies by the active ester method, the activation of the $-\text{COOH}$ groups on the 4-ABA-modified electrode surface was carried out by placing a 5 μL drop of the EDC/Sulfo-NHS mixture onto the working electrode and left to react for 30 min at room temperature in a humid incubation chamber. After the modification, the electrode was rinsed with Milli-Q water and dried under a nitrogen stream.

An aliquot of the capture antibody (Ab) solution ($\sim 300 \mu\text{g ml}^{-1}$ in PBST) was dropped on the activated electrode and incubated at room temperature for 90 min in a humid incubation chamber. Thereafter, the electrode was washed with PBST to remove any unbound Ab and dried under a nitrogen stream. The immunosensors were stored at 4 °C in a Petri dish and could be used until 50 days after their preparation without any significant decrease in the response. It should be mention that only one of the 2 working electrodes available on the dual SPCE was modified with the capture antibody, the other one being used as a control electrode to evaluate the non-specific adsorptions of the enzymatic tracer.

Immunoassay procedure

A previous blocking step of the modified electrode surface was performed by casting a 50 μL drop of a 0.2 % casein solution (in PBST) and keeping for 10 min in a humid incubation chamber. Following fortification of the assay buffer (PBST) with the optimum concentration of the enzymatic tracer and the desired concentration of the antibiotic, the solution was placed in a vortex to ensure adequate mixing of the antibiotic, conjugate and sample matrix. In order to carry out the competitive assay, a 50 μL aliquot of this mixture solution was dropped on the immunosensor surface (covering the 2 working electrodes) and incubated at room temperature for 30 min in a humid incubation chamber. Thereafter, the electrode was thoroughly washed with PBST and the electrochemical measurement was carried out in order to evaluate the extent of the immunoreaction.

Standard SPY curve was prepared in PBST medium. The measured amperometric signals constituted the difference between the steady-state and the background currents. The cathodic signal obtained was plotted as a function of the analyte concentration (in nM units and in

logarithmic scale), and the experimental data were fitted to a four-parameter logistic equation (sigmoidal) according to the formula:

$$y=i_1+\frac{i_2-i_1}{1+10^{(\log IC_{50}-x)\cdot p}} \quad (1)$$

where i_1 is the minimum amperometric signal, i_2 is the maximal amperometric signal, IC_{50} is the concentration producing 50% of the maximal amperometric signal and p is the Hill slope at the inflection point of the sigmoid curve. The limit of detection (LOD) value was calculated as the analyte concentration for which the enzymatic tracer binding to the antibody was inhibited by 10%. The dynamic range (DR) is the analyte concentration interval for which the inhibition of the binding of enzymatic tracer is between 20 and 80%.

Unless otherwise indicated, the presented data corresponded to the average of at least three replicates.

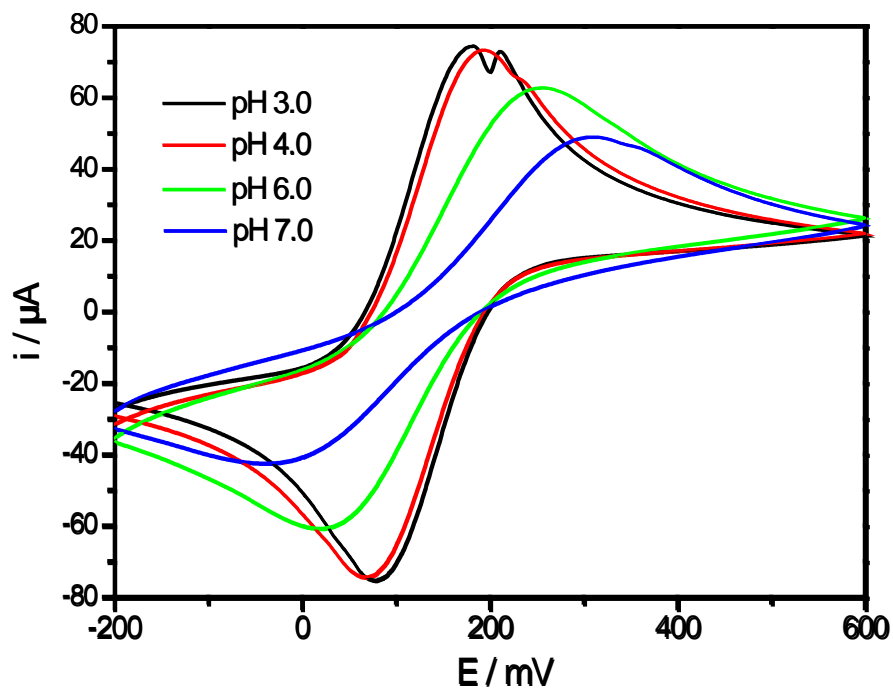


Fig. S-1.- Cyclic voltammograms obtained with the 4-ABA-SPCE in different pH solutions. $\nu=50$ mV s^{-1} .

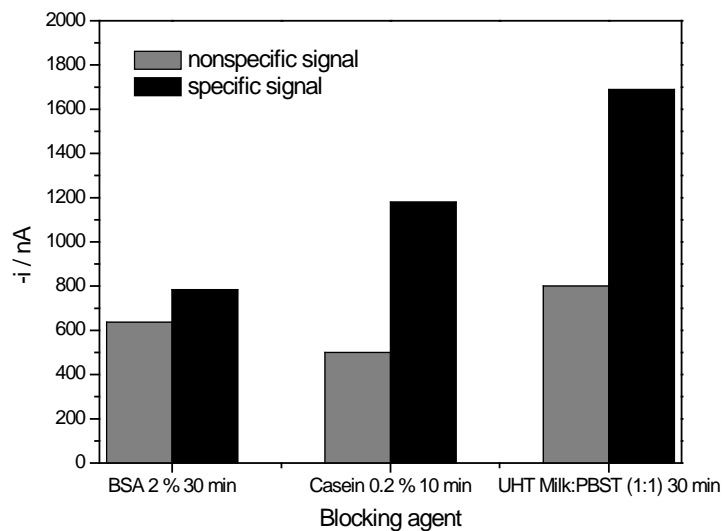


Fig. S-2. Comparison of the efficiency of different blocking solutions: BSA 2 % (w/v), casein 0.2 % (w/v) and 1:1 PBST-diluted UHT whole milk. $[\text{SA7-HRP}] = 5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Table S-1. Optimization of experimental variables.

Experimental variable	Checked range	Selected value
Activation of the –COOH groups	0-60 min	30 min
[Capture antibody]	12-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$	300 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Incubation time with capture antibody	0-240 min	90 min
[SA7-HRP]	1-5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	5 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Incubation time with SA7-HRP	0-60 min	30 min
Medium pH measurement	5.5-7.5	6.0
Applied potential*	-0.25 - -0.05 V	-0.20 V
* vs Ag pseudoreference electrode		

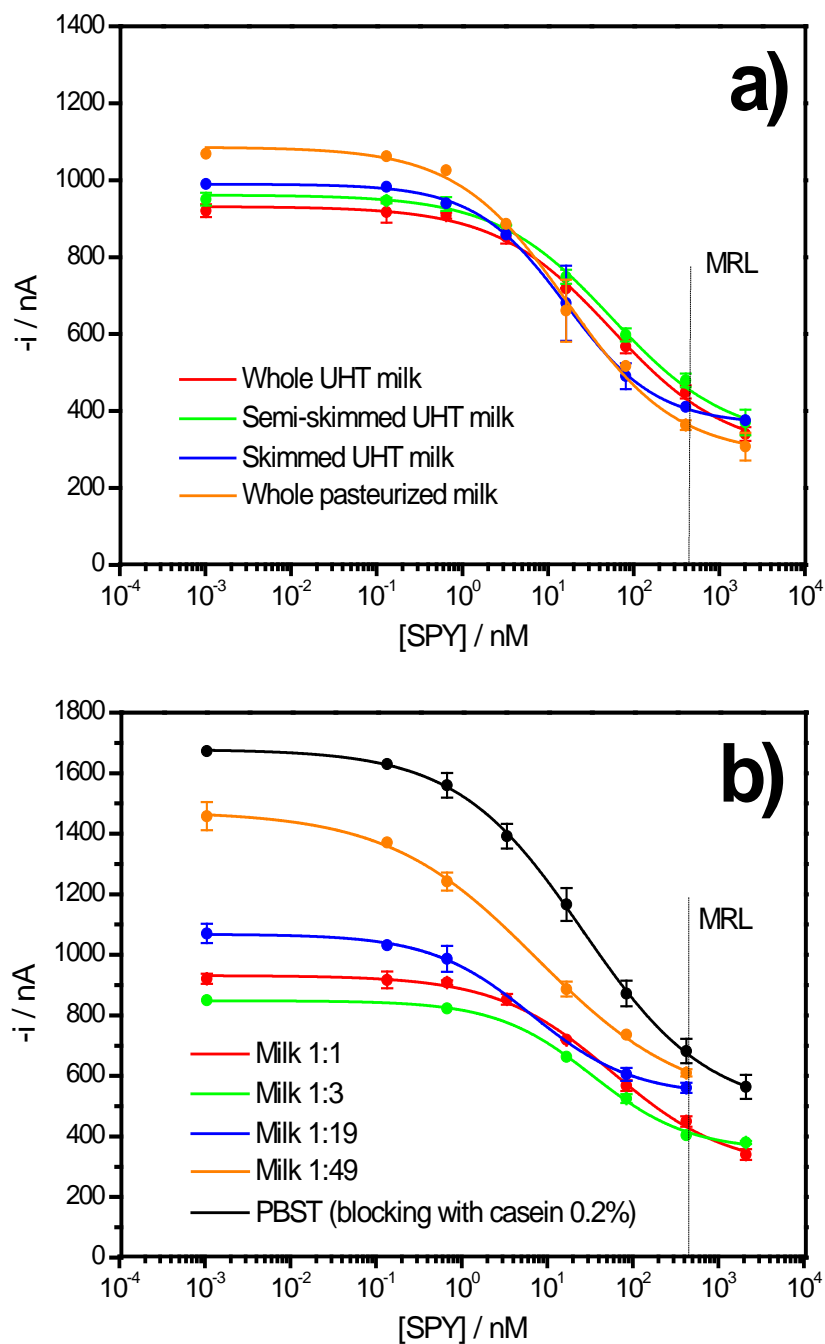


Fig. S-3.- Calibration graphs constructed with the electrochemical immunosensor for (a) different types of milk samples, 1:1 diluted with PBST, spiked with SPY and (b) UHT whole milk samples spiked with SPY after different dilutions with PBST. Error bars estimated as a triple of the standard deviation (n=3).

Table S-2.- Features of the electrochemical immunosensor for the detection of SPY in different milk samples and PBST.

	Pasteurized			UHT milk diluted 1:1			UHT whole milk			PBST*
	milk			diluted 1:1						
	Whole	Whole	Skimmed	Semi-skimmed	Diluted 1:49	Diluted 1:19	Diluted 1:3	Undiluted		
r ²	0.997	0.996	0.999	0.996	0.998	0.999	0.997	0.998	1.000	
IC ₅₀ / nM	13.15	54.69	15.89	54.69	7.22	6.25	32.12	21.65	24.60	
IC ₅₀ / ppb	3.28	13.63	3.96	13.63	1.80	1.56	8.01	5.40	6.13	
LOD / nM	0.82	1.77	1.09	1.77	0.09	0.31	1.84	0.79	0.59	
LOD / ppb	0.21	0.44	0.27	0.44	0.02	0.08	0.46	0.20	0.15	
DR / nM	2.29 - 75.43	6.29 - 475.65	2.92 - 86.31	6.29 - 475.65	0.45 - 116.35	0.94 - 41.67	5.28 - 195.42	2.68 - 175.00	2.35 - 257.59	
DR / ppb	0.6 - 18.8	1.6 - 118.6	0.7 - 21.5	1.6 - 118.6	0.1 - 29.0	0.2 - 10.4	1.3 - 48.7	0.7 - 43.6	0.6 - 64.2	

* including the previous blocking step with casein 0.2 %

Table S-3.- Analytical characteristics obtained for the determination of different sulfonamides in whole UHT milk samples diluted ½ in PBST.

	SPY	SMR	STZ	SMZ	SDZ	SCP
r²	0.997	0.999	0.998	0.999	0.999	0.999
IC₅₀ / nM	54.69	36.16	59.93	157.18	16.79	19.51
IC₅₀ / ppb	13.63	9.56	15.30	43.74	4.20	5.56
LOD / nM	1.77	1.58	3.76	30.22	0.49	0.70
LOD / ppb	0.44	0.42	0.96	8.41	0.12	0.20
DR / nM	6.29 - 475.65	5.02 - 260.27	10.45 - 343.86	55.54 - 444.81	1.81 - 155.67	2.38 - 159.67
DR / ppb	1.6 - 118.6	1.3 - 68.8	2.7 - 87.8	15.5 - 123.8	0.5 - 39.0	0.7 - 45.5

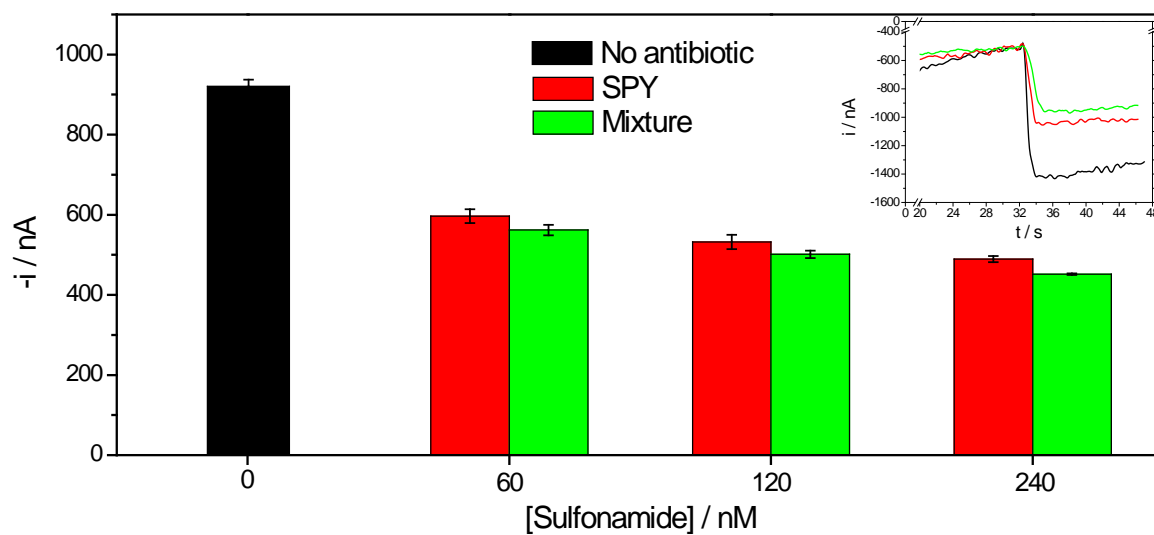


Fig. S-4.- Bars diagram comparing the amperometric responses measured with the developed electrochemical immunosensor in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk samples spiked with different amounts of SPY or with a mixture of 6 sulfonamides (SPY, SMR, STZ, SMZ, SDZ and SCP) at the same total concentration. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$). Inset: amperometric responses obtained for unspiked milk samples and milk samples spiked with SPY or with the 6-sulfonamides mixture at a total concentration of 120 nM.

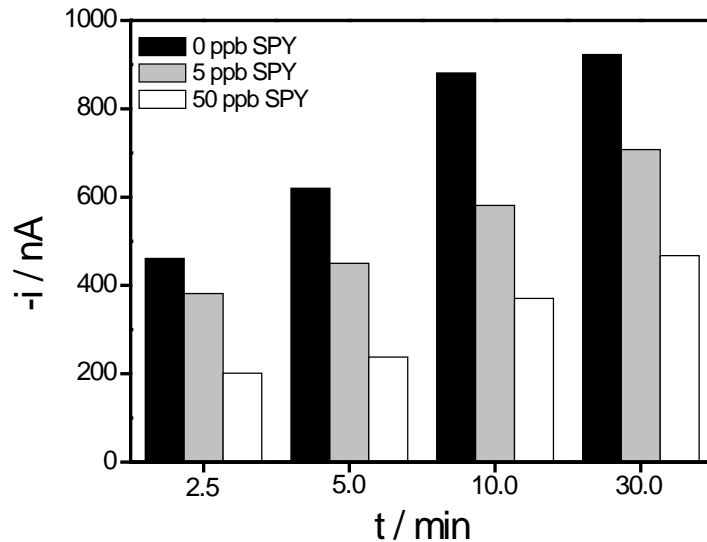


Fig. S-5.- Amperometric signal obtained with different incubation times in 1:1 diluted UHT whole milk samples containing different concentrations of SPY.

References

- Adrian, J.; Font, H.; Diserens, J.-M.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M.-P. 2009. *J. Agric. Food Chem.* 57, 385 – 394.
- Font, H., Adrian, J., Galve, R., Estévez, M.-C., Castellari, M., Gratacós-Cubarsí, M., Sánchez-Baeza, F., Marco, M.-P. 2008. *J. Agric. Food Chem.* 56, 736 – 743.
- Liu, J.; Cheng, L.; Liu, B.; Dong, S. 2000. *Langmuir* 16, 7471 – 7476.

Disposable amperometric magneto-immunosensor for direct detection of tetracyclines antibiotics residues in milk

Analytica Chimica Acta

Volumen: 737

Páginas: 29 – 36

Año de publicación: 2012

DOI: 10.1016/j.aca.2012.05.051





Disposable amperometric magneto-immunosensor for direct detection of tetracyclines antibiotics residues in milk

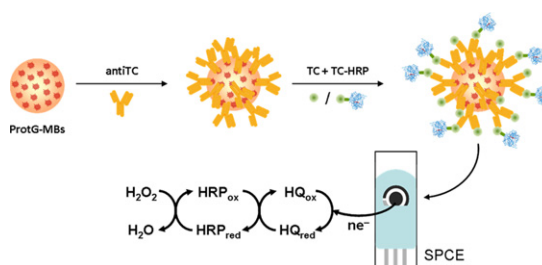
Felipe Conzuelo, María Gamella, Susana Campuzano, A. Julio Reviejo, José M. Pingarrón*

Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- ▶ First disposable amperometric magnetoimmunosensor for detection of TCs in milk.
- ▶ Immunosensor with great sensitivity and broad specificity for TCs detection.
- ▶ LODs achieved for all the TCs tested below the MRLs.
- ▶ Useful and affordable alternative to classical assays for TCs' detection.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 March 2012
Received in revised form 24 May 2012
Accepted 26 May 2012
Available online 4 June 2012

Keywords:

Tetracycline antibiotics
Magnetic beads
Milk
Screen-printed carbon electrodes

ABSTRACT

The preparation and performance of a disposable amperometric magneto-immunosensor, involving the use of a selective capture antibody immobilized on the surface of protein G-functionalized magnetic beads (ProtG-MBs) and screen-printed carbon electrodes (SPCEs), for the specific detection and quantification of tetracyclines (TCs) residues in milk is reported. A direct competitive immunoassay using a tracer with horseradish peroxidase (HRP) for the enzymatic labeling was performed. The amperometric response measured at -0.2 V vs. the silver pseudo-reference electrode of the SPCE upon the addition of H_2O_2 in the presence of hydroquinone (HQ) as redox mediator was used as transduction signal. The developed methodology showed very low limits of detection (in the low ppb level) for 4 tetracycline antibiotics tested in untreated milk samples, and a good selectivity against other antibiotic residues frequently detected in milk and dairy products. The usefulness of the magneto-immunosensor was demonstrated by analyzing UHT whole milk samples spiked with 44 ng mL^{-1} tetracycline (TC) as well as a reference milk containing a certified oxytetracycline (OTC) content. These features, together with the short analysis time (30 min), the simplicity, and easy automation and miniaturization of the required instrumentation make the developed methodology a promising alternative in the development of devices for on-site analysis.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The term 'Tetracycline' refers to several antibiotics of natural or semi-synthetic origin with the same basic chemical structure, a linear tetracyclic fused nucleus with a variety of attached functional groups [1]. Tetracyclines (TCs) are broad spectrum antibiotics discovered in the mid-1900s [2] with a good activity against both Gram-negative and Gram-positive microorganisms [3].

Accordingly, TCs have been widely used in human and veterinary medicine and have been reported as the most intensely used antibiotics in the European Union [4]. TCs work by inhibiting the protein synthesis when they bind to the 30S ribosomal subunit of bacteria, at which the aminoacyl tRNA binds [5]. Tetracycline (TC), oxytetracycline (OTC), chlortetracycline (CTC) and doxycycline (DXC) are among the most widely used and commercially available TCs [2,6]. These antibiotics act very effectively at low doses and are completely excreted from the body after a short residence time. However, they can be accumulated in food products [7]. When animals are bred with TCs over long periods, high levels of antibiotic residues enrich in the animal bones, as well as in fish, meat, eggs

* Corresponding author. Tel.: +34 913944315; fax: +34 913944329.
E-mail address: pingarro@quim.ucm.es (J.M. Pingarrón).

and milk, because of the complexation of TCs with Ca^{2+} [8]. Moreover, TCs are used also as growth promoters in animal husbandry [1].

Consequences of the presence of tetracycline antibiotic residues in food may lead to monetary losses in dairy industry by inhibiting starter cultures in food technological processes [9]. Also in humans they may provoke allergic reactions, liver damage, yellowing of the teeth, gastrointestinal disturbances and bacterial resistances [3]. In order to avoid that, food products need to be tested for residues before use and, therefore, maximum residue limits (MRLs) have been established to ensure human food safety; the European Union has stated the MRLs of TCs in edible products at $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ in milk and muscle, $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ in eggs and $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ in liver [10].

Several analytical methods have been reported for TCs antibiotic residues determination. Chromatographic methods are the most currently applied despite they demand long and tedious extraction procedures, skilled personnel and are quite expensive [2]. Tests based on inhibition of microbial growth are commercially available and also used for routine measurement of TCs in food as they are easy to perform but demand long incubation periods and show lack of specificity [4]. Voltammetric analysis of TCs antibiotics has been also described [11,12]. Nevertheless, the need of sample matrix removal or the use of non-suitable measurement systems (*i.e.* hanging mercury drop electrode) are major drawbacks. Other available methodologies include photoluminescence detection, spectrophotometry, capillary electrophoresis and titrimetry [6,12], but they are time consuming and not useful for field analysis.

Rapid, accurate and sensitive methods are required to detect TCs residues in routine assays. Owing their simplicity and cost-effectiveness, immunochemical methods are particularly useful in this field. They are usually able to detect low residues concentrations in a short time without extraction or clean-up steps. ELISA methods are the most used immunoanalytical strategies for residues determination [1]. Principal disadvantages of these methods are their frequently high background, the large number of incubation and washing steps required and their difficulty to be automated.

Magnetic beads (MBs) are a powerful and versatile tool employed in a variety of analytical applications. They facilitate efficient target analyte retrieval and concentration, reduce largely the assay time and favor analytical procedures more applicable to higher sample throughput and automation [13]. Their use minimizes matrix effect due to washing and separation procedures and, since the beads are in suspension, allows faster assay kinetics to be achieved [14]. The use of MBs has also been considered a methodological approach that enhances sensitivity and reduces detection time in electrochemical immunosensors performance [15]. Moreover, such approach allows the separation of steps related to the immunoreaction from those concerning the electrochemical detection thus facilitating the transduction of the affinity event [14].

This paper describes the first developed amperometric immunosensor for the detection of TCs antibiotics in milk samples. Quantification is achieved through competitive binding between sample tetracycline antibiotic and a HRP-labeled specific tracer for binding sites of the capture antibodies immobilized on the surface of commercial ProtG-MBs. The electrochemical detection of the enzyme product is carried out after capturing the modified MBs on a SPCE, and using HQ as electron transfer mediator and H_2O_2 as the enzyme substrate. The magneto-immunosensor performance, including the analytical characteristics for the determination of different TCs and the selectivity against other antibiotics are evaluated. The developed magneto-immunosensor was successfully applied to the analysis of low level-spiked milk samples after just a simple dilution pre-treatment. The obtained results demonstrated that the developed disposable magneto-immunosensor offers a

broad specificity for the detection of TCs antibiotics residues in milk at the low ppb concentration level as a rapid method which may be applied for on-site food quality control.

2. Materials and methods

2.1. Apparatus and electrodes

Amperometric measurements were performed with a CHI812B potentiostat (CH Instruments, Inc., Austin, TX, USA) controlled by software CHI812B. All measurements were carried out at room temperature.

The transducers employed were screen-printed carbon electrodes (SPCEs) (DRP-110, DropSens, Oviedo, Spain) consisting of one carbon working electrode (4 mm diameter), a carbon counter electrode and an Ag pseudo-reference electrode.

A Bunsen (Madrid, Spain) AGT-9 Vortex was used for the homogenization of the spiked samples. A magnetic separator (DynaMagTM-2) was purchased from Invitrogen Dynal, AS (Oslo, Norway) and a constant temperature incubator shaker from Iwymen-Comecta (Barcelona, Spain) was also used.

2.2. Reagents and solutions

All the reagents were of the highest available grade. Tween[®]20, hydroquinone (HQ), hydrogen peroxide (30%, w/v), doxycycline hyclate (DXC), oxytetracycline hydrochloride (OTC), tetracycline hydrochloride (TC), and amoxicillin (AMOX) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Chlortetracycline hydrochloride (CTC), sulfapyridine (SPY), penicillin G sodium salt (PENG), cefapirin (CEF) and enrofloxacin (ENRO) were from Fluka (St. Louis, MO, USA). Sodium di-hydrogen phosphate, di-sodium hydrogen phosphate, sodium hydrogen carbonate, potassium chloride and sodium chloride were purchased from Scharlau (Sentmenat, Spain). Sodium carbonate anhydrous and dimethyl sulfoxide (DMSO) were acquired from Panreac (Barcelona, Spain). Stock solutions (10 mM) of different antibiotics were prepared in DMSO (AMOX, SPY, CEF and ENRO), in PBST (TC, OTC and PENG) or in carbonate buffer (CTC and DXC). Antibiotic standard solutions for the construction of the corresponding calibration plots were prepared daily upon dilution of the stock solutions in PBST or in 1:1-PBST diluted milk.

Magnetic beads functionalized with protein G (30 mg mL⁻¹, Dynabeads[®] Protein G) were from Invitrogen Dynal, AS (Oslo, Norway). These functionalized particles allow binding the Fc region of capture antibodies employed.

Polyclonal sheep antiTC antibody (ab30591) was obtained from Abcam (Cambridge, UK), being its immunogen TC-conjugated BSA through amide bond. The enzyme tracer, horseradish peroxidase-conjugated tetracycline (TC-HRP) was acquired from Abiox (Newberg, OR, USA).

All buffer solutions were prepared with Milli-Q water (18 M Ω cm at 25 °C). Phosphate-buffered saline (PBS) is 0.01 M phosphate buffer solution containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl, pH 7.5. PBST is PBS with 0.05% Tween[®]20. Carbonate buffer is 0.05 M carbonate buffer solution, pH 9.6.

Whole UHT milk samples (regular and Ca^{2+} enriched) were purchased in a local supermarket, spiked, and analyzed after 1:1 dilution with PBST.

Moreover, a certified lyophilized milk, ERM[®]-BB492 (LGC Standards, Teddington, UK), containing $101 \pm 11 \mu\text{g kg}^{-1}$ OTC, was also analyzed.

2.3. Magnetic beads modification

A 5- μL aliquot of ProtG-MBs suspension was transferred into a 1.5 mL plastic tube and washed two times with 100 μL PBS in

order to remove the sodium azide preservative. Each washing step entailed a re-suspension of the beads, followed by removal of the supernatant with aid of magnetic separation. The MBs were then re-suspended in 50 μL of a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ antiTC solution in PBS and incubated for 30 min at 37 °C with shaking at 600 rpm. Subsequently, the tube was placed in the magnetic separator, the supernatant removed and the beads washed two times with PBST. The MBs bearing the capture Ab were subsequently used for TCs determination or re-suspended in 50 μL PBS and stored at 4 °C until use.

2.4. Immunoassay procedure

PBST (or 1:1 PBST diluted milk) solutions containing the optimized concentration of the enzymatic tracer and the desired concentration of the antibiotic were mixed with the vortex. The antiTC-MBs prepared as described in Section 2.3 were re-suspended in a 50- μL aliquot of this mixed solution (PBST or 1:1 PBST diluted milk containing the enzymatic tracer and the antibiotic) and incubated at 37 °C for 30 min with vigorous shaking (600 rpm). Thereafter, the tube with the beads was positioned on the magnetic separator and the supernatant was removed. The beads were then washed two times with PBST and re-suspended in 50 μL of 0.05 M phosphate buffer pH 6.0.

2.5. Electrochemical measurements

The suspension of MBs modified with the immunoconjugate was transferred onto the SPCE working electrode which was positioned on a homemade magnet holding block (see Fig. 1b).

Amperometric measurements in stirred solutions were performed by applying the desired detection potential and allowing the steady-state current to be reached. The magnet holding block-SPCE (with the modified MBs captured on its surface) assembly was transferred to an electrochemical cell (see Fig. 1c) containing 10 mL 0.05 M phosphate buffer pH 6.0 and 1.0 mM HQ (prepared daily just before the electrochemical measurement) and the amperometric responses ($E_{\text{app}} = -0.20\text{ V}$ vs. Ag pseudo-reference electrode) were recorded upon addition of 50 μL of a 0.1 M H_2O_2 solution until the steady-state current was reached (approx. 1 min).

Standard TC curve was prepared in PBST medium. The plotted amperometric signals constituted the difference between the steady-state and the background currents and the experimental data were fitted to the following four-parameter logistic equation (sigmoidal):

$$y = i_1 + \frac{i_2 - i_1}{1 + 10^{(\log \text{IC}_{50} - x) \cdot p}} \quad (1)$$

where i_2 and i_1 are the maximum and minimum current values of the calibration graph obtained, IC_{50} is the analyte concentration producing 50% of the maximal amperometric signal and p is the Hill slope at the inflection point of the sigmoid curve. The limit of detection (LOD) value was calculated as the analyte concentration for which the enzymatic tracer binding to the antibody was inhibited by 10% [16]. The dynamic range (DR) was taken as the analyte concentration interval for which the inhibition of the binding of enzymatic tracer was between 20 and 80%.

Unless otherwise indicated, the reported data corresponded to the average of at least three replicates.

2.6. Selectivity studies

Cross-reactivity from other non-target antibiotics was evaluated by measuring the competitive signals (at 313 and 10,000 nM concentration levels) under the optimized conditions in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk.

2.7. Analysis of milk samples

Firstly, recovery studies were made using UHT whole milk (regular and Ca-enriched, with Ca^{2+} contents of 1200 and 1600 mg L^{-1} , respectively) stored in refrigerator (4 °C) until use. The milk samples were 1:1 diluted with PBST and spiked with the appropriate concentration of the enzymatic tracer and the antibiotic. Aliquots (50 μL) of the spiked milk samples were analyzed following the methodology described in Section 2.4. Non-spiked samples were also checked to exclude the presence of naturally contaminating antibiotics.

Moreover, a certified reference milk containing $101 \pm 11\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ OTC was also analyzed. The glass vial containing the lyophilized milk was stored at -20 °C until use. According to the instructions recommended by the supplier, the material was reconstituted in deionized water by gentle stirring and mixing up to total dissolution. OTC determination was performed after a 1:1 PBST dilution of the reconstituted milk following the procedure described in Section 2.4. The amperometric responses were interpolated into the calibration plot for OTC constructed in 1:1 PBST-diluted whole milk samples.

3. Results and discussion

Since TCs antibiotics are low molecular weight molecules, containing only one antigen determinant, a competitive immunoassay format was performed. In the competitive scheme employed in this work (Fig. 2), TCs antibiotics competed with a fixed concentration of the enzymatic tracer (TC-HRP) for a limited number of the antigen binding sites of the capture antibodies immobilized on the ProtG-MBs surface.

The suitability of the proposed assay design was verified by comparing the amperometric responses obtained at an applied potential of -0.20 V (vs. the Ag pseudo-reference electrode) after implementing the protocol in the presence and the absence of antibiotic. The measured current was approximately two times lower when the process was performed in the presence of 222 ng mL^{-1} TC, demonstrating that a lower amount of TC-HRP was attached in the presence of free antibiotic and that the proposed competitive immunoassay was suitable for the electrochemical detection of the antibiotic-antibody recognition process.

A usual drawback found in the development of electrochemical immunosensors is the occurrence of non-specific adsorptions on the electrode surface, which makes necessary the use of blocking agents. This problem can be avoided if the affinity reaction is not performed at the electrode surface, as occurring in the methodology involving the use of MBs. Moreover, preliminary studies (not shown) showed that very low amperometric signals were observed when TC-HRP (1:100 dilution) was incubated with ProtG-MBs in the absence of antiTC, thus demonstrating that no significant unspecific adsorption of the enzyme-labeled antigen occurred on the ProtG-MBs. However, the amperometric signal increased more than 30 times when ProtG-MBs were firstly incubated in a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ antiTC solution, thus verifying the suitability of the proposed strategy for the electrochemical detection of TC-antiTC recognition processes.

3.1. Optimization of the experimental variables

All the experimental variables involved in the immunosensor preparation and functioning were optimized by taking as the selection criterion the current values measured at -0.20 V (with the obvious exception of the detection potential value optimization) when no tetracycline antibiotic was present. Table 1 summarizes the selected values for the different variables involved.

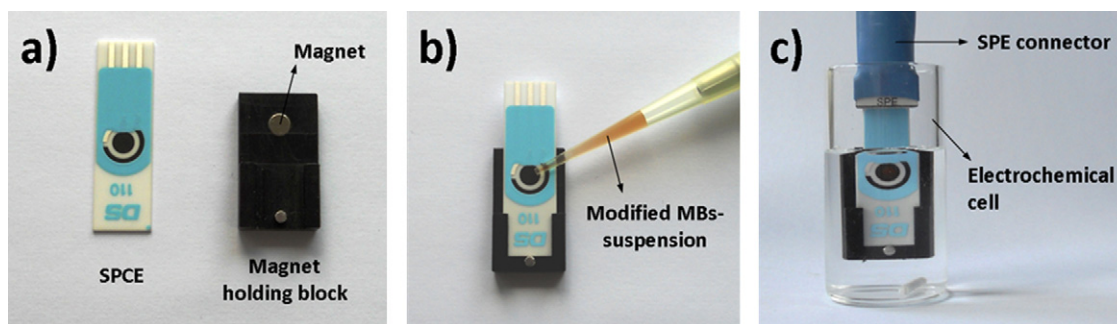


Fig. 1. Picture showing the SPCE and the homemade magnet holding block (a), the deposition of the modified MBs on the SPCE assembled on the magnet holding block (b) and the assembly SPCE-magnet holding block immersed in the electrochemical cell used for the amperometric measurements (c).

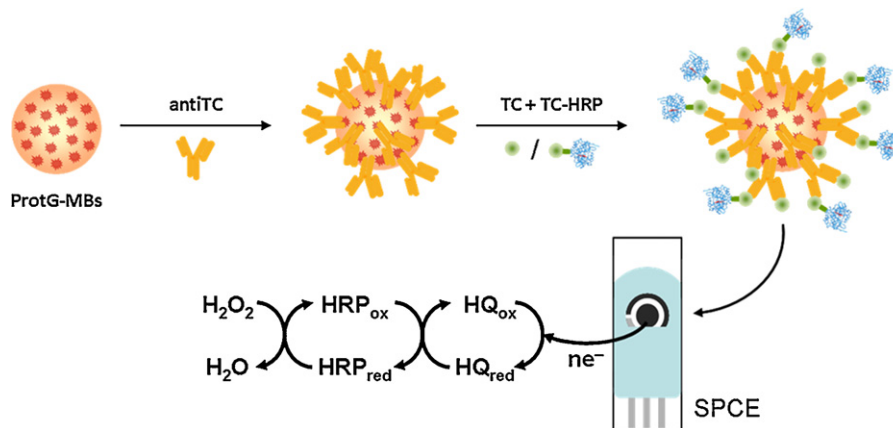


Fig. 2. Schematic display of the developed TCs antibiotics magneto-immunosensor.

3.2. Analytical characteristics of the developed immunosensor

TC was selected as the model antibiotic to evaluate both the stability and the analytical performance of the developed magneto-immunosensor. The calibration graph obtained in PBST, under the optimized working conditions specified in Table 1, is displayed in Fig. 3. The DR ranged between 12.5 and 676.2 ng mL⁻¹, and the IC₅₀ and LOD calculated values were 91.8 ng mL⁻¹ and 3.9 ng mL⁻¹, respectively. It is important to remark that this LOD value is approximately 25 times lower than the limits fixed by the EU legislation (100 ppb of TCs content in edible samples). Therefore, the obtained results are promising and encouraging for the further application of the electrochemical magneto-immunosensor in the rapid analysis of food samples such as milk.

3.3. Analytical characteristics of the immunosensor in milk

The performance of the immunosensor with milk samples was evaluated in whole UHT (regular and Ca-enriched) untreated milk

Table 1
Experimental variables evaluated in the preparation of the disposable immunosensor for TCs.

Experimental variable	Selected value
$V_{\text{ProtG-MBs}}$, μL	5.0
V_{antiTC} , μL	50
t_{antiTC} , min	30
$[\text{antiTC}]$, $\mu\text{g mL}^{-1}$	50.0
$V_{\text{TC-HRP}}$, μL	50
$t_{\text{TC-HRP}}$, min	30
TC-HRP, dilution	1:100

which was measured after just a 1:1 dilution with PBST or undiluted.

Table 2 summarizes the IC₅₀, LOD and DR values obtained from the calibration graphs constructed for TC in all the milk samples tested. As it can be seen, the analytical performance of the immunosensor is very attractive in all the samples tested allowing limits of detection below 10 ng mL⁻¹ to be achieved, which clearly demonstrated the suitability of the developed immunosensor to be applied for the analysis of milk according to the EU legislation. In order to check the effect of the presence of Ca²⁺ in the sample, due to the claimed complexation of TCs with Ca²⁺ and other

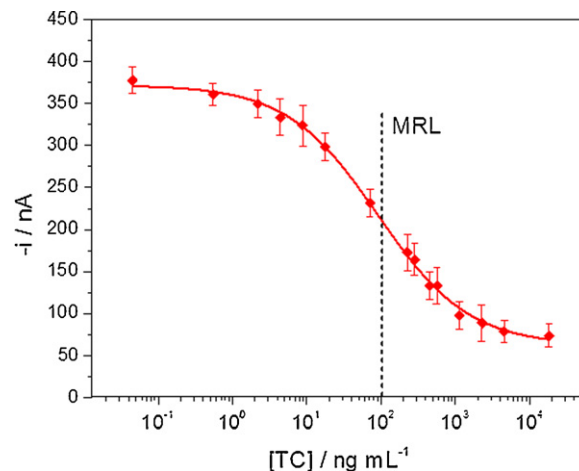


Fig. 3. Calibration curve for TC in PBST buffer. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n = 3$).

Table 2

Analytical characteristics of the calibration graphs constructed with the developed immunosensor for TC in spiked whole UHT milk samples.

	Milk:PBST (1:1)	Ca-enriched milk:PBST (1:1)	Ca-enriched milk (undiluted)
r^2	0.987	0.996	0.998
IC_{50} , ng mL ⁻¹	49.0	58.1	31.8
LOD, ng mL ⁻¹	1.9	8.9	1.7
DR, ng mL ⁻¹	6.3–380.7	17.8–189.6	5.0–202.5

multivalent cations [3], we performed repetitive assays with the immunosensor for 88 ng mL⁻¹ TC in the Ca²⁺-enriched milk sample after different incubation times. The results obtained showed no significant changes in the current with respect to the initial measured value even for periods of time of 5 days. This demonstrated that the performance of the magneto-immunosensor was not significantly affected by the presence of Ca²⁺ in the sample during such a period of time and, consequently, it is not necessary to supplement the working media with EDTA to perform the analysis. It is important to remark that the amperometric responses were always significantly larger when milk samples were employed than when using PBST as working medium. This can be attributed to the presence of Ca²⁺ ions in milk, and it was verified by adding the same amount of Ca²⁺ labeled for Ca-supplemented milk to PBST solutions, obtaining much larger signals than those recorded in pure PBST. This effect should be partially due to the enhancement of the conjugated enzyme activity [17] and also to the claimed stabilization of proteins in milk as a consequence of Ca²⁺ addition [18].

The broad specificity of the capture antibody was tested by constructing calibration curves for the other 3 most commonly employed TCs in 1:1 diluted Ca-enriched UHT whole milk samples (Fig. 4). Table 3 summarizes the analytical characteristics calculated from these calibration graphs. As can be observed, OTC and DXC were highly recognized by the magneto-immunosensor, providing LOD values of 1.2 and 0.7 ng mL⁻¹, respectively, which are far below the MRLs set by the EU Regulation. However, a remarkably worse recognition was observed for CTC with a LOD value of 66.8 ng mL⁻¹.

The reproducibility of the responses obtained with different immunosensors was evaluated both within the same working day and between days by performing measurements in PBST or in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk samples in the absence or in the presence of TC. Results for 6 different immunosensors prepared in the same day yielded a RSD value of 1.3% for the

amperometric responses measured for 44 ng mL⁻¹ TC in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk. Moreover, RSD values of 2.6 and 5.2% were obtained in the absence of TC and in PBST or 1:1 PBST-diluted UHT whole milk solutions, respectively, when 4 different magneto-immunosensors were prepared and employed in different days. These results demonstrated that the immunosensor fabrication procedure was reliable, and that reproducible amperometric responses can be obtained with different magneto-immunosensors constructed in the same manner.

The stability of antiTC-MBs conjugates was evaluated by preparing on the same day different conjugates which were stored at 4 °C in plastic tubes containing PBS (pH 7.5). A couple of the prepared conjugates were incubated into a fresh solution of TC–HRP or a mixture of TC (44 ng mL⁻¹) and TC–HRP, according to the protocol described in the Experimental Section, each working day. Fig. 5 displays the control charts constructed by taking the mean value of 5 measurements obtained the first day of this study as the central value. The upper and lower control limits (dashed lines) were set at $\pm 3 \times SD$ of this initial value. As can be seen, the responses obtained both in the absence and in the presence of free antibiotic remained within the control limits for at least 20 days, indicating a high stability of the antibody-modified MBs conjugates which can be prepared and stored until the immunoassays have to be carried out.

3.4. Magneto-immunosensor selectivity

The selectivity of the developed magneto-immunosensor was tested against 6 non-target antibiotics frequently present in milk and dairy products. These studies were performed by comparing the amperometric signals obtained with the magneto-immunosensor in the absence and in the presence of these potentially interfering antibiotics at two different concentration levels (313 and 10,000 nM) in 1:1 diluted Ca-enriched UHT whole

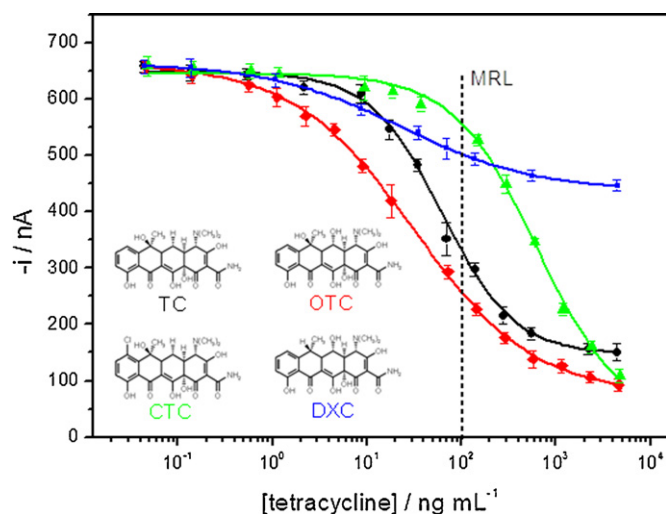


Fig. 4. Calibration graphs obtained with the immunosensor in 1:1 PBST-diluted Ca-enriched UHT whole milk samples for different TCs antibiotics (TC, OTC, CTC and DXC).

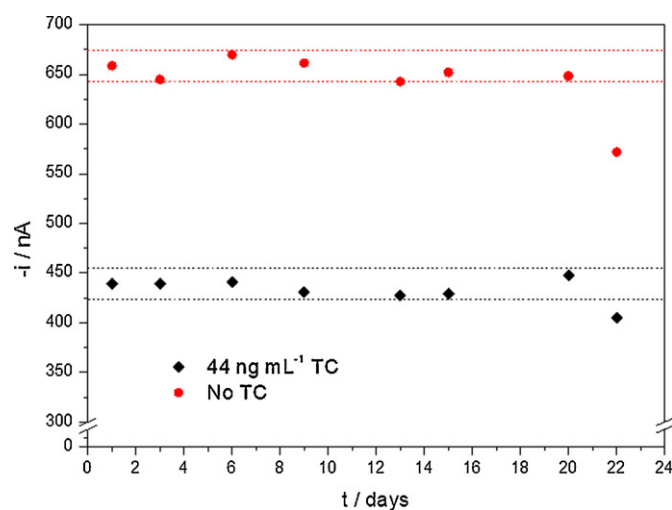
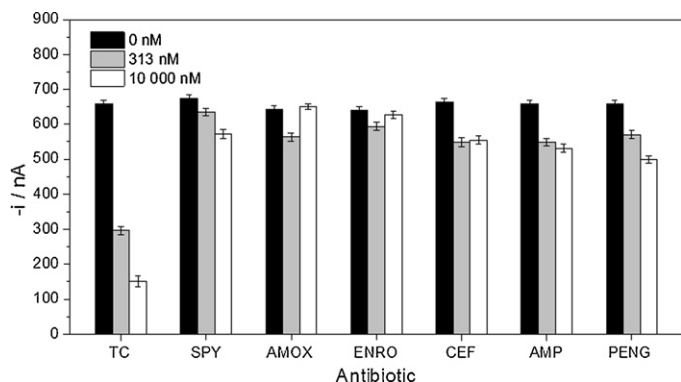


Fig. 5. Control chart constructed to check the stability of antiTC-MBs conjugates stored in PBS (pH=7.5) at 4 °C. Measurements correspond to the amperometric signals obtained in the presence or in the absence of free TC.

Table 3

Analytical characteristics obtained for the determination of different TCs in 1:1 PBST-diluted Ca-enriched whole UHT milk samples.

	TC	OTC	CTC	DXC
r^2	0.996	0.999	0.996	0.999
IC_{50} , ng mL $^{-1}$	58.1	31.3	537.2	24.6
LOD, ng mL $^{-1}$	8.9	1.2	66.8	0.7
DR, ng mL $^{-1}$	17.8–189.6	4.0–242.3	144.2–2001.9	2.6–234.9
% CR	100	192	12	246

**Fig. 6.** Selectivity against 6 non-target antibiotics (SPY, AMOX, ENRO, CEF, AMP and PENG, for comparison purposes results with TC are also shown) in 1:1 PBST-diluted Ca-enriched UHT whole milk samples.

milk samples. Fig. 6 shows that no significant cross-reactivity occurred for SPY, AMOX and ENRO even in the presence of a high excess (10,000 nM). Moreover, considering the results shown for CEF, AMP and PENG, we calculated the percentage of cross-reactivity (CR%) for these non-target antibiotics according to the equation:

$$CR\% = \frac{IC_{50} (TC)}{IC_{50}(\text{cross-reacting compound})} \times 100 \quad (2)$$

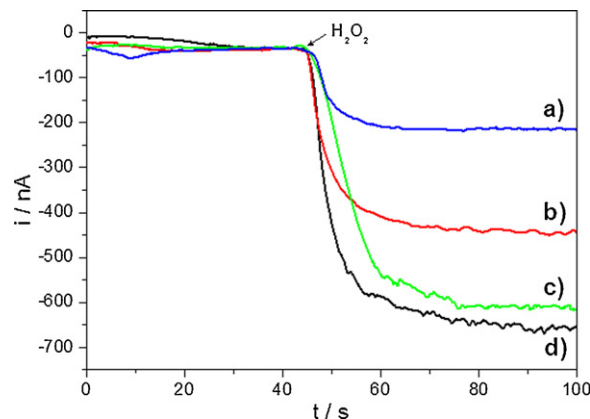
The obtained values were <1% in all cases demonstrating that no significant competition was produced and the remarkable group specificity of the capture antibody used to prepare the magneto-immunosensor.

3.5. Analysis of milk samples

The usefulness of the amperometric magneto-immunosensor for the analysis of real samples was evaluated by analyzing 1:1 diluted Ca-enriched UHT whole milk solutions (antibiotic-free) spiked with TC at a 44 ng mL $^{-1}$ concentration level as well as a reference material with a certified OTC content.

The analysis of the TC spiked milk samples was accomplished by interpolation of the measured current values into the calibration plot constructed for the antibiotic in the same matrix sample (Fig. 4). The analysis of eight milk solutions yielded a TC mean concentration of 43.8 \pm 0.5 ng mL $^{-1}$ with a mean recovery of (99 \pm 1)%, the confidence interval being calculated for $\alpha = 0.05$. As an example, Fig. 7 displays the amperometric signals obtained from a non-spiked milk solution (curve d) and for milk samples spiked with different TC concentrations: 2.2 (c), 44.0 (b) and 2222.2 ng mL $^{-1}$ (a).

Regarding the reference material, the possible existence of a matrix effect was firstly evaluated by comparing the amperometric signals obtained for the 1:1 PBST diluted reconstituted certified milk and whole UHT milk samples both spiked with four different OTC concentrations (100, 200, 300 and 400 ng mL $^{-1}$). The measured current values showed no significant differences between the same concentrations independently of the sample matrix and, therefore, the determination of OTC in the certified milk could be

**Fig. 7.** Amperometric signals obtained in the analysis of a non-spiked (d) and 2.2 (c), 44.0 (b) and 2222.2 ng mL $^{-1}$ (a) TC spiked 1:1 PBST-diluted Ca-enriched whole UHT milk samples. The arrow indicates H $_2$ O $_2$ addition.

accomplished by interpolation of the amperometric values measured for the 1:1 PBST diluted reconstituted reference milk into the calibration plot constructed for OTC in 1:1 PBST diluted whole UHT milk (see Fig. 4). The analysis of 8 aliquots of the reference milk yielded an OTC mean content of 105 \pm 5 μ g kg $^{-1}$, the confidence interval being calculated for $\alpha = 0.05$ (RSD $_{n=8}$ = 5.4%). This value was statistically compared with the certified value according to the procedure described in: ERM Application Note 1 [19]. Since Δ_m (4.3) < U_Δ (11.7), it can be concluded that no significant differences were found between the result of the method and the certified value for a confidence level of about 95%.

Taking into account the type of analysis carried out and the straightforwardness of the experimental protocol, these can be considered as very good results, demonstrating the usefulness of the disposable magneto-immunosensor for the determination of very low TCs antibiotics concentrations in milk samples without sample treatment, in a total time for the assay of approximately 30 min (once the antiTC-MBs are prepared).

3.6. Comparison with other immunoassays reported in the literature

Although the absence of other electrochemical immunosensors reported previously for TCs hinders an exhaustive comparison, the analytical performance of the immunosensor has been compared with that of other TCs immunoassay methods described in the literature (see Table 4). As it can be deduced, only 4 of the reported methodologies were applied to the determination of these antibiotics in milk samples and none of them used electrochemical transduction. It should be also mentioned that, with the exception of the works of Kloth et al. [20] and Suárez et al. [21], the described methodologies required a large dilution or a time-consuming pre-treatment of the milk samples to carry out the determination. The only reported methodology that provides a better LOD for TC in milk samples [3] requires a sixfold longer time of analysis and a laborious sample pretreatment. In fact, the time required to perform the analysis with the magneto-immunosensor (~30 min)

Table 4
Comparison of the analytical characteristics of the developed magneto-immunosensor with other reported immunoassays for TCs determination.

Immunoassay protocol	Detection type	IC ₅₀ , ppb	DR, ppb	LOD, ppb	Sample	Assay time	Reference
ELISA	Optical	–	–	0.05 (TC)	Water	1.5 h (+ELISA plate coating: o/n)	[22]
Indirect competitive ELISA	Optical	6.52 (TC) 139 (DXC) 21.71 (OTC) 63.82 (CTC)	1.15–38.89 (TC)	0.40 (TC)	Honey (diluted 1/20 (w/v) in PBST and filtered)	2 h (+ELISA plate coating: o/n)	[23]
Indirect heterologous competitive ELISA	Optical	3.9×10^3 (TC) 3.5×10^3 (CTC) $<2.0 \times 10^5$ (OTC)	0.1–100 × 10 ³ (TC)	10 (TC)	Milk diluted 1:20	5.5 h (+ELISA plate coating: o/n)	[24]
Biotin-avidin mediated competitive ELISA	Optical	–	0.14–140 (TC)	0.048 (TC)	Milk (after removing interferences involving protein, fat and cations by strong acid and acidic deproteination agents) Diluted honey	3 h and 10 min (+ELISA plate coating: 3 h)	[3]
Biotin-avidin mediated competitive ELISA	Optical	–	1.52–152 (TC)	0.19 (TC)	Diluted honey	160 min (+ELISA plate coating: 3 h)	[25]
Indirect competitive chemiluminescence microarray immunoassay	Optical	0.63 (TC)	0.05–43 (TC)	–	Milk	6 min (+chip coating: 15 h)	[20]
Multiplexed competitive immunoassay integrated on a lab on a chip	Optical	–	–	100	Milk	10 min	[21]
Multiplexed microimmunoassay based on a DVD support	Optical	5.91 (TC)	1.25–66.12 (TC)	0.10 (TC)	Water	30 min (+DVD coating: 16 h)	[26]
Indirect competitive ELISA and TR-FIA	Optical	OTC: 29–71 (ELISA)/16–17 (TR-FIA) TC: 4.7–7.4 (ELISA)/2.13–4.97 (TR-FIA) CTC: 73–140 (ELISA)/51.0–81.7 (TR-FIA)	OTC: 3–600 (ELISA)/0.2–380 (TR-FIA) TC: 0.4–35 (ELISA)/0.5–65 (TR-FIA) CTC: 4–570 (ELISA)/0.8–410 (TR-FIA)	OTC: 1.6–16 (ELISA)/0.08–1.2 (TR-FIA) TC: 0.14–8 (ELISA)/0.3–9 (TR-FIA) CTC: 0.9–54 (ELISA)/0.1–49 (TR-FIA)	Fish (extraction and clean-up)	2 h and 10 min (both methodologies) (+ELISA plate coating: o/n)	[7]
Competitive immunoassay using TC-HRP on antiTC-modified MBs	Amperometry ($E_{app} = -0.20$ V vs. Ag pseudo ref. electrode)	Buffer: 91.8 (TC) Undiluted milk: 71.5 (TC)	Buffer: 12.5–67.6 (TC) Undiluted milk: 5.0–202.5 (TC)	Undiluted milk: 3.9 (TC) milk: 1.9 (TC)	Undiluted milk	30 min (+antiTC-MBs preparation: 30 min)	This work

Abbreviations: CTC, chlortetracycline; DXC, doxycycline; DVD, digital versatile disk; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; o/n, overnight; OTC, oxytetracycline; TC, tetracycline; TR-FIA, time-resolved fluoroimmunoassay.

compares advantageously with other immuno-approaches described in the literature for the sensitive detection of this kind of antibiotic residues in milk samples.

Nevertheless, in order to evaluate the possibility of reducing even more the assay time, we compared the amperometric signals obtained with the magneto-immunosensor for non-spiked or TC-spiked at the concentration level demanded by legislation (100 ng mL^{-1}) 1:1 diluted milk solutions for different incubation times. As expected, the amperometric responses were smaller where shorter incubation times were applied. However, the signal decrease measured after only 5 min incubation (16% vs. 34% observed for 30 min incubation, data not shown) is still sufficient to distinguish clearly between antibiotic-free milk and contaminated milk solutions. These results outline the potential of the presented methodology as a quick method for alarm or screening purposes to classify the samples according to the current legislation.

Finally, another important advantage to be claimed for our approach against ELISA methodologies is the much easier potential automation.

4. Conclusions

This work describes the first disposable amperometric magneto-immunosensor for the specific and sensitive detection of TCs antibiotics in milk solutions. The obtained results demonstrate a broad specificity of the immunosensor and its ability to detect and quantify low levels of tetracycline antibiotic residues reliably, specifically and rapidly in milk with no need for complex pre-treatment steps (just a dilution with the working buffer). The LODs achieved for all the TCs tested, between 0.7 and 66.8 ng mL^{-1} , are well below the maximum total TCs content permitted by current legislation.

The great exhibited analytical performance, together with the use of disposable mass-produced sensors, makes the developed magneto-immunosensing platform an interesting, useful and affordable alternative to classical assays for the detection of TCs antibiotics. Moreover, the simplicity and easy automation and miniaturization of the required instrumentation pave the way to integrate the quality control analysis in the milk intake process at the field or farm or just in the dairy tankers that arrived to the dairy industries.

Acknowledgements

The financial support of the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación Research Project CTQ2009-09351BQU, and the AVANSSENS Program from the Comunidad de Madrid (S2009PPQ-1642) are gratefully acknowledged. Felipe Conzuelo acknowledges a FPU fellowship from the Spanish Ministry of Education.

References

- [1] N. Pastor-Navarro, A. Maquieira, R. Puchades, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 907–920.
- [2] C.R. Anderson, H.S. Rupp, W.-H. Wu, *J. Chromatogr. A* 1075 (2005) 23–32.
- [3] M. Jeon, J. Kim, K.-J. Paeng, S.-W. Park, I.R. Paeng, *Microchem. J.* 88 (2008) 26–31.
- [4] N. Moeller, E. Mueller-Seitz, O. Scholz, W. Hillen, A.A. Bergwerff, M. Petz, *Eur. Food Res. Technol.* 224 (2007) 285–292.
- [5] D.E. Brodersen, W.M. Clemons Jr., A.P. Carter, R.J. Morgan-Warren, B.T. Wimberly, V. Ramakrishnan, *Cell* 103 (2000) 1143–1154.
- [6] J.M. Traviesa-Alvarez, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 589 (2007) 51–58.
- [7] C. Cháfer-Pericás, A. Maquieira, R. Puchades, J. Miralles, A. Moreno, N. Pastor-Navarro, F. Espinós, *Anal. Chim. Acta* 662 (2010) 177–185.
- [8] J. Wang, H. Wu, C.Z. Huang, *Sci. China Ser. B-Chem.* 52 (2009) 188–195.
- [9] J. Kurittu, S. Lönnberg, M. Virta, M. Karp, *J. Agric. Food. Chem.* 48 (2000) 3372–3377.
- [10] Commission Regulation (EU) No 37/2010, *Off. J. Eur. Union L* 15 (December (1)) (2009).
- [11] P. Masawat, J.M. Slater, *Sens. Actuators B-Chem.* 124 (2007) 127–132.
- [12] Y. Ni, S. Li, S. Kokot, *Food Chem.* 124 (2011) 1157–1163.
- [13] L. Chen, L. Deng, L. Liu, Z. Peng, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1487–1492.
- [14] S. Centi, S. Laschi, M. Mascini, *Talanta* 73 (2007) 394–399.
- [15] M. Pedrero, S. Campuzano, J.M. Pingarrón, *Electroanalysis* 24 (2012) 470–482.
- [16] J. Adrian, S. Pasche, D.G. Pinacho, H. Font, J.-M. Diserens, F. Sánchez-Baeza, B. Granier, G. Voirin, M.-P. Marco, *Trend. Anal. Chem.* 28 (2009) 769–777.
- [17] A.I. Coates, M.P. Cook, R. Feezor, M.D. Schuh, *J. Inorg. Biochem.* 72 (1998) 63–69.
- [18] C.O. Parker, I.E. Tothill, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2452–2457.
- [19] T. Lisinger, European Commission - Joint Research Centre Measurements (IRMM), *ERM Appl. Note* 1 (2005) 1–2.
- [20] K. Kloth, M. Rye-Johnsen, A. Didier, R. Dietrich, E. Märtilbauer, R. Niessner, M. Seidel, *Analyst* 134 (2009) 1433–1439.
- [21] G. Suárez, Y.-H. Jin, J. Auerswald, S. Berchtold, H.F. Knapp, J.-M. Diserens, Y. Leterrier, J.-A.E. Manson, G. Voirin, *Lab. Chip.* 9 (2009) 1625–1630.
- [22] K. Kumar, A. Thompson, A.K. Singh, Y. Chander, S.C. Gupta, *J. Environ. Qual.* 33 (2004) 250–256.
- [23] N. Pastor-Navarro, S. Morais, A. Maquieira, R. Puchades, *Anal. Chim. Acta* 594 (2007) 211–218.
- [24] Y. Zhang, S. Lu, W. Liu, C. Zhao, R. Xi, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 211–218.
- [25] M. Jeon, I.R. Paeng, *Anal. Chim. Acta* 626 (2008) 180–185.
- [26] S. Morais, L.A. Tortajada-Genaro, T. Arandis-Chover, R. Puchades, A. Maquieira, *Anal. Chem.* 81 (2009) 5646–5654.

**An amperometric affinity penicillin-binding protein
magnetosensor for the detection of β -lactam antibiotics
in milk**

Analyst

Volumen: 138

Páginas: 2013 – 2022

Año de publicación: 2013

DOI: 10.1039/c3an36727d

Analyst



PAPER

An amperometric affinity penicillin-binding protein magnetosensor for the detection of β -lactam antibiotics in milk

Cite this: *Analyst*, 2013, **138**, 2013

M. Gamella,^{†a} S. Campuzano,^{†a} F. Conzuelo,^a M. Esteban-Torres,^b B. de las Rivas,^b A. J. Reviejo,^a R. Muñoz^b and J. M. Pingarrón^{*a}

The preparation, characterization and performance evaluation of an amperometric affinity disposable magnetosensor, based on the use of a recombinant penicillin-binding protein (PBP) and screen-printed carbon electrodes (SPCEs), for the specific detection and quantification of β -lactam antibiotic residues in milk are reported. The PBP was immobilized onto His-Tag-Isolation-modified magnetic beads (His-Tag-Isolation-MBs), and a direct competitive assay using a tracer with horseradish peroxidase (HRP) for the enzymatic labeling was performed. The amperometric response obtained at -0.20 V vs. the Ag pseudo-reference electrode of the SPCE after the addition of H_2O_2 in the presence of hydroquinone (HQ) was used as the transduction signal. The developed methodology showed very low detection limits (in the low ppb level) for the 6 antibiotics tested in untreated milk samples, and a good selectivity against other antibiotic residues frequently detected in milk and dairy products. Due to the bioreceptor employed, this methodology was able to detect only the active form of β -lactam antibiotics with high affinities for both penicillins and cephalosporins. Moreover, the analysis took only 30 min.

Received 13th August 2012

Accepted 1st February 2013

DOI: 10.1039/c3an36727d

www.rsc.org/analyst

Introduction

Penicillins and other β -lactam antibiotics (*i.e.* penicillins and cephalosporins) are the most frequently used antibiotics in veterinary medicine for treatment of various bacterial infections, *e.g.*, mastitis in dairy cows. This may lead to the presence of antibiotic residues in milk and a small quantity of these compounds might be responsible for allergic reaction in humans and for the development of resistant strains of bacteria.¹ Consequently, detection of β -lactam antibiotic residues in food and environment is crucial for public health protection. In order to assure the safety and quality of dairy products, a number of regulatory authorities have decreed maximum residue levels (MRLs). For example, the European Union Regulation 508/1999 set the MRL for benzylpenicillin in milk at 4 ppb or 1.2×10^{-8} M.²

The most common methods for the analysis of veterinary drugs make use of liquid chromatography.^{3,4} These methods are reliable and possess adequate sensitivity for enforcement of the maximum residue limits or tolerance levels of antibiotic residues in different samples. However, HPLC methods require

extensive sample pretreatment and are thus mostly used in centralized laboratories. As a consequence, the development of rapid, inexpensive, sensitive and on-site analytical strategies with high sample throughput suitable to be used in a wide variety of food matrices and by untrained personnel constitutes a challenge.⁵

A variety of commercial test kits and strips are available for rapid screening of β -lactam antibiotics in certain samples.^{6,7} These screening tests can be divided into microbial inhibitor assays,⁸ enzymatic assays,⁹ immunoassays^{10,11} and receptor assays.^{12,13} The first approach examines the growth of test microorganisms in the presence of the sample, and therefore it is time consuming and non-specific. Enzyme inhibition methods are based on the specific inhibitory effect of β -lactams on certain enzymes and are more rapid.¹⁴ In the case of immunoassays, the development of antibodies that are specific to the intact β -lactam structure has been achieved with limited success¹⁵ because the immunisation procedure leads to the open-ring forms of the β -lactams and consequently to antibodies against hydrolysed penicillins.¹⁶ Moreover, these test systems can only detect penicillins and not the whole group of β -lactams including cephalosporins.

The receptor binding assays do not use antibodies to bind antibiotics although the principles of these tests are analogous to immunological methods.¹² The binding bioreceptors are bacterial proteins which are inhibited by β -lactams. The action mechanism is based on the inhibition of membrane-bound

^aDepartamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain. E-mail: pingarro@quim.ucm.es; Fax: +34 913944329; Tel: +34 913944315

^bLaboratorio de Biotecnología Bacteriana, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, C/Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

[†] These authors have equally contributed to this work.

**Integrated amperometric affinity biosensors using Co^{2+} –
tetradentate nitrilotriacetic acid modified disposable carbon
electrodes: application to the determination of β -lactam
antibiotics**

Analytical Chemistry

Volumen: 85

Páginas: 3246 – 3254

Año de publicación: 2013

DOI: 10.1021/ac303604b



Integrated Amperometric Affinity Biosensors Using Co^{2+} –Tetradentate Nitrilotriacetic Acid Modified Disposable Carbon Electrodes: Application to the Determination of β -Lactam Antibiotics

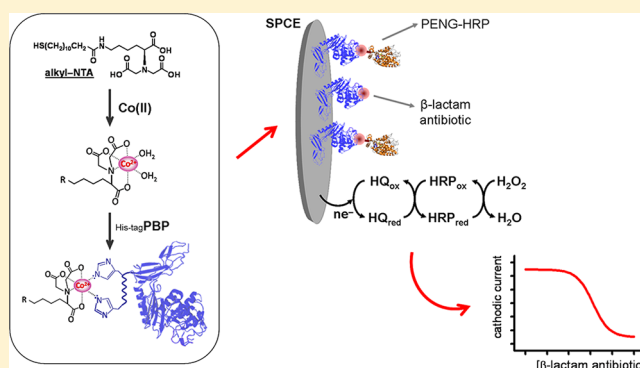
Felipe Conzuelo,[†] María Gamella,[†] Susana Campuzano,[†] Paloma Martínez-Ruiz,[‡] María Esteban-Torres,[§] Blanca de las Rivas,[§] A. Julio Reviejo,[†] Rosario Muñoz,[§] and José M. Pingarrón^{*,†}

[†]Departamento de Química Analítica, and [‡]Departamento de Química Orgánica I, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

[§]Laboratorio de Biotecnología Bacteriana, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, C/Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

S Supporting Information

ABSTRACT: A novel strategy for the construction of disposable amperometric affinity biosensors is described in this work. The approach uses a recombinant bacterial penicillin binding protein (PBP) tagged by an N-terminal hexahistidine tail which was immobilized onto Co^{2+} –tetradentate nitrilotriacetic acid (NTA)-modified screen-printed carbon electrodes (SPCEs). The biosensor was employed for the specific detection and quantification of β -lactam antibiotics residues in milk, which was accomplished by means of a direct competitive assay using a tracer with horseradish peroxidase (HRP) for the enzymatic labeling. The amperometric response measured at -0.20 V versus the Ag pseudoreference electrode of the SPCE upon the addition of H_2O_2 in the presence of hydroquinone (HQ) as redox mediator was used as the transduction signal. The developed affinity sensor allowed limits of detection to be obtained in the low part-per-billion level for the antibiotics tested in untreated milk samples. Moreover, the biosensor exhibited a good selectivity against other antibiotics residues frequently detected in milk and dairy products. The analysis time was of approximately 30 min.



Many efforts have been done in the last years to achieve the immobilization of biological macromolecules on electrode surfaces with a significant retention of their activity. Among the large variety of immobilization strategies described (adsorption, covalent attachment, polymer encapsulation, electrostatic or hydrophobic interactions, etc.), methods based on affinity ligands or biospecific recognitions are particularly attractive because (i) the activity of the immobilized biomolecule is generally preserved, (ii) the spatial distribution can be well-controlled, (iii) the efficiency of the specific immobilization can be high, making it possible to work with low biomolecule loadings, and (iv) the stability of the biomolecule is usually improved.¹ One of the most versatile and powerful affinity ligand methods is based on the use of metal ion chelating agents and their specific affinity for proteins containing histidine residues, which constitutes a standard tool in affinity chromatography (immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC). The coordination of appropriate chelating agents such as the tridentate iminodiacetic acid (IDA) or the tetradentate nitrilotriacetic acid (NTA) to bivalent metal cations (e.g., Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}) allows further ligation of the free coordination sites of the chelator–metal complex to

the imidazole moieties of the histidine tags thus enabling a localized, oriented, and reversible immobilization of proteins.² The histidine tag possesses a small size, and its position at the protein surface can be controlled, thus leading to an oriented immobilization without interfering with structure and function of the protein.³ This latter point is of significant importance in analytical approaches involving heterogeneous biomolecular recognitions because the random attachment of an affinity protein can alter its binding capacity resulting from steric hindrance of adjacent immobilized proteins or with the surface itself.¹ This histidine-tagged protein immobilization chemistry has been widely reported on gold supports using different approaches.^{4–8} However, carbon electrodes have been scarcely used with this purpose due to the laborious and time-consuming multiple chemical steps of functionalization required for their modification.¹

On the other hand, the development of receptor–ligand-based biosensing strategies can result in rapid and sensitive

Received: December 12, 2012

Accepted: February 19, 2013

Published: February 19, 2013

analytical methodologies for a wide range of analytes. In this work we used penicillin-binding proteins (PBPs) as molecular receptors. PBPs are enzymes found in the cytoplasmic membrane of bacteria involved in the growth of the microorganisms by maintaining and determining cellular morphology.⁹ They catalyze transpeptidation reactions resulting in glycan chains cross-linking by short peptides, as well as the elongation of these glycan chains by transglycosylation.¹⁰ β -Lactams bind irreversibly to the active site of PBPs due to their analogy with the 2-peptide D-alanyl-D-alanine, leading to the PBPs inactivation by acylation of the active site serine residue involved in the transpeptidase reaction.¹¹

β -Lactams are frequently prescribed in veterinary medicine for the treatment of mastitis in lactating dairy cows¹² and constitute one of the most commonly identified antimicrobial group found in milk. Misuse of antibiotic drugs relies on public health risks causing allergic reactions in sensitized individuals or affecting the intestinal flora of consumers and financial losses due to the inhibition of growth of starter cultures used for food technological processes.¹³ Moreover, it is also important the fact that low-level doses of antibiotics in foodstuffs during long periods may lead to the spread of drug-resistant microorganisms.¹⁴ Maximum residue limits (MRLs) have been established by the European Union for common β -lactams antibiotics based on their potency. For example, the MRL for amoxicillin, ampicillin, and benzylpenicillin is $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ in milk, while for cefapirin it is $60 \mu\text{g kg}^{-1}$.^{15,16} Although the analysis of veterinary drugs residues is generally made by liquid chromatography, there is a high demand for rapid and inexpensive analytical methods for the screening of β -lactam antibiotics in certain samples. Actually, a variety of commercial test kits and strips are available.^{17,18} In this context, immunoanalytical methods show some limitations since many are nonspecific or not sufficiently sensitive because the chemical reactivity of the β -lactam ring avoids the synthesis of specific and sensitive antibodies against β -lactam antibiotics.¹⁹ Moreover, microbial inhibition tests, which are the only tests recognized by the European Union as screening methods for penicillins, require a few hours of incubation and, since they are not selective among antibiotics, sometimes may give false positives.¹⁸ All these considerations support the development of receptor ligand based strategies leading to rapid, specific, and sufficiently sensitive analytical methodologies available to be used by untrained personnel.

In this paper, we describe a novel, extremely simple, versatile, and fast approach for the functionalization of carbon electrodes in a single step with dense monolayers of chelating agents without need for applying any previous harsh pretreatment to the electrode surface. We report herein the first successful adsorption of long alkyl chains-NTA derivatives on disposable carbon electrodes and the use of the resulting film for the subsequent coordination of cobalt ions and the histidiny residues in the tagged PBP, allowing the immobilization of the receptor protein in a reproducible and reversible manner, with a controlled molecular orientation and maintaining its entire biological activity. The resulting integrated amperometric affinity sensor allows the quantification of β -lactam antibiotics residues in milk at the low part-per-billion concentration level through competitive binding between sample β -lactam and a HRP-labeled specific tracer for the binding sites of the immobilized PBP. The electrochemical detection of the enzyme product was carried out using hydroquinone (HQ) as electron-transfer mediator and H_2O_2 as the enzyme substrate.

MATERIALS AND METHODS

Apparatus and Electrodes. Amperometric measurements were performed with a CHI812B potentiostat (CH Instruments, Inc., U.S.A.) controlled by software CHI812B. All measurements were carried out at room temperature (RT). Impedance and voltammetric measurements were accomplished using a μ Autolab Type III FRA 2 instrument. A Bunsen AGT-9 vortex was used for homogenization of the samples.

The transducers employed for the development of the integrated amperometric affinity sensors were screen-printed carbon electrodes (SPCEs) (DRP-C1110, DropSens) consisting of two elliptic carbon working electrodes ($\phi \sim 2 \text{ mm}$), a carbon counter electrode, and a Ag pseudoreference electrode. A specific cable connector (DRP-BICAC also from DropSens) acted as the interface between the SPCE and the potentiostat.

Reagents and Solutions. All the reagents used were of the highest available grade. N -[N_α -Bis(carboxymethyl)-L-lysine]-12-mercaptododecanamide (HS-NTA), N_α -Bis(carboxymethyl)-L-lysine hydrate (ANTA), Tween20, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, sodium acetate, hydroquinone (HQ), hydrogen peroxide (30%, w/v), lauroyl chloride, 4-(N,N -dimethylamine)pyridine (DMAP), ampicillin sodium salt (AMP), and tetracycline hydrochloride (TC) were purchased from Sigma-Aldrich. The enzyme tracer, HRP-conjugated β -lactam (PENG-HRP) was acquired from United States Biological. Sulfapyridine (SPY), cefapirin sodium salt (CEF), and enrofloxacin (ENRO) were from Fluka. Sodium dihydrogen phosphate, disodium hydrogen phosphate, potassium chloride, sodium hydrogen carbonate, and sodium chloride were purchased from Scharlau. Sodium carbonate anhydrous, dimethyl sulfoxide (DMSO), and cobalt(II) chloride were acquired from Panreac. Copper(II) chloride was from Merck, A.G. Nickel(II) nitrate and zinc nitrate were acquired from Probus S.A. Imidazole was purchased from Acros. All buffer solutions were prepared with Milli-Q water ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ at 25°C). Acetate buffer, pH 4.5, was prepared from 0.1 M sodium acetate and carbonate buffer, pH 9.6 from 0.05 M carbonate buffer solution. Binding and washing buffer (B&W) was 50 mM phosphate buffer solution, pH 8.0, containing 300 mM NaCl and 0.01% Tween20. Pull and down buffer (P&D) was 3.25 mM phosphate buffer solution pH 7.4 containing 70 mM NaCl and 0.01% Tween20. PBST is phosphate-buffered saline (0.01 M phosphate buffer solution containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl, pH 7.5) with 0.05% Tween20.

The 10 mM stock solutions of the different antibiotics were prepared in DMSO (SPY and ENRO) or in P&D buffer (AMP, CEF, and TC) and stored at 4°C . Antibiotic standard solutions were prepared daily upon dilution of the corresponding stock solutions in P&D buffer or in milk. Hydrolyzed β -lactams solutions were prepared by dissolving 10 mg of the antibiotic (AMP or CEF) in 9.8 mL of methanol (Scharlab) and 0.2 mL of 1.0 M potassium hydroxide (Scharlab) and left to react overnight at 4°C .¹³

Whole UHT milk samples were purchased in a local supermarket, spiked, and used for the determination of β -lactams after 1:1 dilution with P&D buffer.

Synthesis of Lauroyl-NTA. Lauroyl-NTA (N^2,N^2 -bis(carboxymethyl)- N^6 -dodecanoyllysine, LAU-NTA) was synthesized as follows: 93 mg (0.76 mmol) of DMAP and 243 μL (3.05 mmol) of pyridine were successively added to a

suspension of 200 mg (0.76 mmol) of ANTA in 5 mL of DMF at room temperature while vigorously stirring. After 10 min, 220 μL (0.92 mmol) of lauroyl chloride was added and the mixture was stirred for 2 days at room temperature. Then the solvent was evaporated in vacuum, and the crude was dissolved in 2 mL of water. After carefully acidification with 1.0 M hydrochloric acid, the resulting precipitate was filtered and successively washed with water and diethyl ether to give the title compound (56% yield). Experimental data agree with those previously described by Richard et al.²⁰

Preparation of Co^{2+} -NTA-Modified SPCEs. In order to functionalize with the NTA layer, 5 μL of a 1.0 mM HS-NTA or a 3.0 mM LAU-NTA solution (prepared in carbonate buffer) was cast on the working electrode surface and incubated 2.5 h at room temperature in a humidified chamber. After washing with deionized water and drying with nitrogen, the resulting NTA-modified SPCE was activated by complexation of Co^{2+} by treatment with 5 μL of a 7.5 mM CoCl_2 solution (prepared in acetate buffer) for 30 min, followed by thorough washing with deionized water and drying under a nitrogen stream. The Co^{2+} -loaded electrodes showed no damage when they were left on the benchtop for 3 days before use (no longer times were checked).

Penicillin Binding Protein Production, Overexpression, and Purification. Protocols used for recombinant His-tagged PBP protein production, overexpression, purification and storage were the same than those employed in an earlier paper.²¹

Affinity Biosensor Preparation. Recombinant PBP was immobilized on the Co^{2+} -NTA-modified electrodes through the protein His-tag. In order to do that, a 5 μL aliquot of the PBP solution (880 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was dropped on the modified electrode surface and incubated at room temperature for 20 min. Thereafter, the electrode was washed with PBST to remove any unbound protein and dried under a nitrogen stream.

Electrochemical Measurements. Impedimetric and cyclic voltammetric measurements were carried out upon deposition of 50 μL of a $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5.0 mM in each component, solution in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 on the modified electrode surface. Electrochemical impedance measurements were performed at the equilibrium potential of the $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ pair, with a 10 mV (rms) sinusoidal excitation amplitude and an automatic analyzer integration time (0.001% SD of $-I(j\omega)$ correlator output) with a 100 s cutoff time. Measurements were made at 20 steps per decade in the appropriate frequency range five times at each frequency and averaged during each run. Cyclic voltammograms were recorded from -0.40 to 0.60 V (vs Ag pseudoreference electrode, which shows a potential difference with a SCE of -256 ± 19 mV) at a scan rate of 50 mV s^{-1} .

Amperometric measurements in stirred solutions were performed by applying the desired potential and allowing the steady-state current to be reached. The sensors were transferred to an electrochemical cell containing 10 mL of a 0.1 M phosphate buffer pH 6.0 and 1.0 mM HQ (prepared daily just before the electrochemical measurement), and the amperometric responses at $E_{\text{app}} = -0.20$ V versus Ag pseudoreference electrode were recorded after the addition of 50 μL of 0.1 M H_2O_2 . The time required to reach the steady-state current was approximately 1.5 min.

Affinity Assay Procedure. A calibration curve for AMP was constructed in the assay buffer (1.0 M NaCl-enriched P&D

buffer) containing the optimized enzymatic tracer concentration and different concentrations of the β -lactam antibiotic. The solutions were placed in a vortex to ensure adequate mixing of the components. The competitive assay was performed by casting of a 50 μL aliquot of the corresponding mixture solution on the biosensor surface and incubation at RT for 30 min. Thereafter, the electrode was thoroughly washed with PBST and the electrochemical measurement was carried out.

The recorded amperometric signals were the difference between the steady-state and the background currents. They were plotted as a function of the analyte concentration, and the experimental data were fitted to a four-parameter logistic equation (sigmoidal) according to the equation

$$y = i_1 + \frac{i_2 - i_1}{1 + 10^{(\log \text{IC}_{50} - x)p}} \quad (1)$$

where i_2 and i_1 are the maximum and minimum current values in the plotted calibration graph, IC_{50} is the analyte concentration producing 50% of the maximal amperometric signal, and p is the Hill slope at the inflection point of the sigmoid curve. The limit of detection (LOD) was calculated as the analyte concentration for which the enzymatic tracer binding to the PBP was inhibited by 10%. The dynamic range (DR) was defined as the analyte concentration interval for which the inhibition of the enzymatic tracer binding was between 20% and 80%. Unless otherwise indicated, the presented data corresponded to the average of at least three replicates and the confidence intervals calculated for $\alpha = 0.05$.

Analysis of AMP in Milk. Commercial milk samples purchased in a local supermarket were appropriately diluted with P&D buffer solution and spiked with the β -lactam antibiotic and the enzymatic tracer. Aliquots (50 μL) of these milk solutions were analyzed following the same methodology described above for standard solutions. Nonspiked samples were also checked to exclude the presence of naturally contaminating antibiotics.

RESULTS AND DISCUSSION

The strong adsorption of long alkyl chains leading to the formation of ordered physisorbed monolayers onto carbon electrode surfaces²² was profited to perform the modification of SPCEs with long alkyl-NTA derivatives.^{23–25} Thermodynamic studies demonstrated that the hydrocarbon molecules adsorb with high affinity to graphite surfaces and that the heat of adsorption increases with chain length suggesting that the molecules are adsorbed with their long axis parallel to the graphite surface as confirmed by scanning tunneling microscopy (STM), X-ray, and neutron diffraction studies.²⁶ In order to verify this, we evaluated by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) the adsorption of two long alkyl chain NTA derivatives, a thiolated HS-NTA and the nonthiolated analogue (LAU-NTA) on carbon electrodes (see Figure S1, Supporting Information). Coverage percentages were calculated from the charge-transfer resistance values at the modified and unmodified electrodes.²⁷ The obtained values ($74\% \pm 3\%$ and $70\% \pm 7\%$, for HS-NTA and LAU-NTA, respectively) suggested that no significant differences in the coverage were found for both NTA derivatives and demonstrated the successful adsorption of both compounds on SPCEs generating dense layers in only 2.5 h. This fact confirmed that the thiol

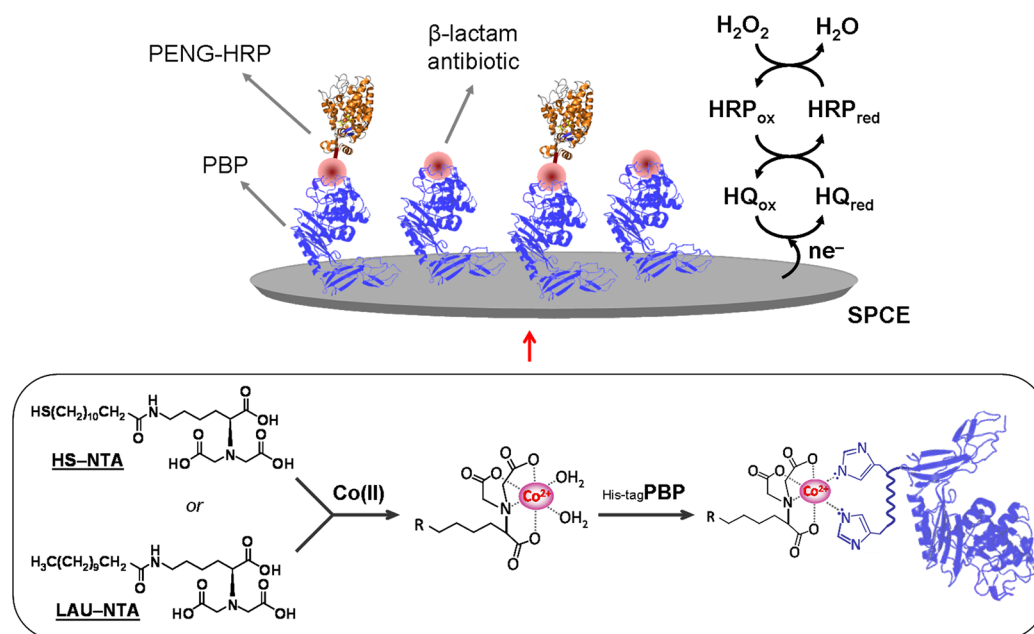


Figure 1. Schematic display of steps involved in the development of the affinity biosensor. Bottom inset: details of the surface chemistry involved on the immobilization of the recombinant histidine-tagged PBP by using Co^{2+} -NTA-modified SPCEs.

moiety did not play a major role in the adsorption of long alkyl chain NTA derivatives on a carbon surface.

As commented above, recombinant PBP immobilization was accomplished through the interactions between the protein His-tag and the Co^{2+} -NTA functionality existing at the modified electrode surfaces. The employed scheme involved the competition of the unlabeled analyte and a fixed concentration of the enzymatic tracer (PENG-HRP) for the limited number of binding sites of the recombinant binding protein immobilized on the SPCE surface using the Co^{2+} /NTA chemistry (see Figure 1).

First, the successful modification of the electrode surface with the Co^{2+} -NTA moiety and the subsequent immobilization of the PBP were verified by monitoring the stepwise assembly using cyclic voltammetry (CV) and EIS. Figure 2 shows the CVs recorded for the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redox pair at a bare SPCE, and after the successive modifications with HS-NTA,

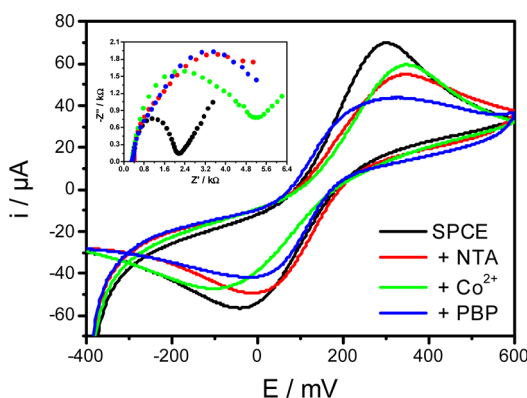


Figure 2. Cyclic voltammograms and Nyquist plots ($-Z''$ vs Z') obtained at a bare SPCE, NTA-SPCE, Co^{2+} -NTA-SPCE, and PBP- Co^{2+} -NTA-SPCE for 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1) in a 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 solution. EIS parameters: 0.01–10 000 Hz frequency range with a 0.01 V rms signal at +0.25 V (vs Ag pseudoreference electrode); CV, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Co^{2+} , and PBP, whereas the inset of Figure 2 displays the corresponding EIS Nyquist plots. As expected, the quasi-reversible voltammetric response observed at the unmodified SPCE was strongly attenuated at the HS-NTA-modified SPCE, reflecting the electrostatic repulsion between the redox pair and the $-\text{COO}^-$ groups at neutral pH. This repulsion provoked the anodic shift of the formal electrode potential upon the electrode modification with the HS-NTA moiety. This effect disappears as the carboxylates groups in the ligand are chelated to the metal ion.¹ Also, a slight increase in the peak current was observed after Co^{2+} complexation which can be attributed to the partial shielding of the negative surface charges by complexed Co^{2+} ions.²⁸ The PBP immobilization on the Co^{2+} -NTA-SPCE caused an additional barrier for the access of the redox probe to the electrode thus leading to a further decrease in the voltammetric signal showing the ability of the Co^{2+} -NTA-SPCEs to bind recombinant PBP via N-terminal hexahistidine tail. These results are also consistent with the changes observed in the electron-transfer resistance (Figure 2 inset).

On the other hand, similar amperometric responses were obtained for solutions containing no β -lactam antibiotic with biosensors constructed using both HS-NTA- and LAU-NTA-modified SPCEs (Figure S2, Supporting Information). Therefore, taking into account that the adsorption of both compounds takes place by the long alkyl group and not by the terminal functional group, we decided to continue working only with the commercial HS-NTA derivative.

Optimization of Experimental Variables. The optimum experimental conditions for achieving the best affinity assay performance were sought out. All the experimental variables involved in the affinity sensor preparation and functioning were, therefore, optimized by taking as the selection criterion the maximum current measured at -0.20 V in the absence of β -lactam antibiotics.

First, in order to evaluate the extent of enzymatic tracer nonspecific binding to the Co^{2+} -NTA-SPCE surface, we compared the responses measured with and without the PBP

immobilized on the modified SPCE in a solution of the enzymatic tracer in P&D buffer. Nonspecific adsorption of PENG–HRP occurred at the PBP-free Co^{2+} –NTA–SPCE surface, leading to an amperometric signal 19% lower than that measured at the PBP– Co^{2+} –NTA–SPCE. Therefore, we performed the competitive reaction in different working media with the aim of minimizing the nonspecific signal. The ratios between the specific and the unspecific responses were calculated for P&D buffer solution supplemented with NaCl (1.0 M) and for P&D buffer 1:1 diluted UHT whole milk. As it can be seen in Figure 3, that ratio increased notably in both

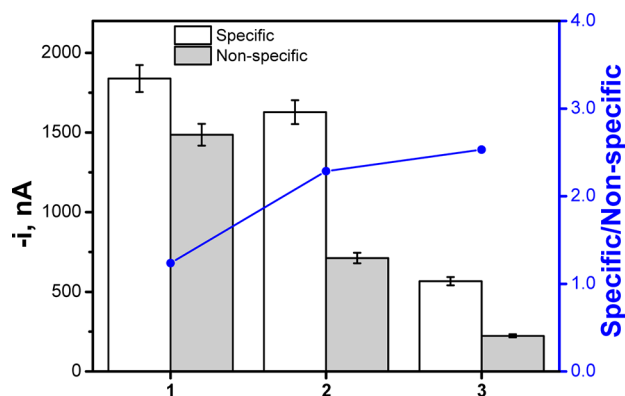


Figure 3. Amperometric responses measured at -0.20 V for solutions containing PENG–HRP in the absence of β -lactam antibiotics with the Co^{2+} –NTA–SPCE (nonspecific signals) and with the PBP– Co^{2+} –NTA–SPCE (specific signal) as well as their corresponding ratios in P&D buffer (1), 1.0 M NaCl-enriched P&D buffer (2), and 1:1 P&D buffer-diluted UHT whole milk (3). Error bars were estimated as a triple of the standard deviation ($n = 3$).

media as a consequence of a remarkable decrease in the nonspecific binding of the enzymatic tracer due to the presence of the high ionic salt or milk matrix components.¹⁵ Accordingly, a P&D buffer solution containing 1.0 M NaCl was chosen as the working medium to evaluate the analytical performance of the affinity biosensor.

Thereafter, the variables involved in the affinity biosensor preparation and functioning were optimized according to the selection criterion mentioned above. The ranges tested for all these variables as well as the selected values are collected in Table 1. It is worthwhile to remark that the functionalization of the SPCE surface with the NTA derivative provided a stable monolayer with the thiol tether not attached to the electrode thus implying a larger accessible potential window when compared with thiolated chain-modified gold electrodes.

Table 1. Optimization of Experimental Variables Involved in the Preparation and Functioning of the PBP– Co^{2+} –NTA–SPCE Affinity Biosensor

exptl variable	checked range	selected value
[NTA], mM	0.0–25	1.0 (HS-NTA)/3.0 (LAU-NTA)
t_{NTA} , h	0.5–o/n ^a	2.5
$t_{\text{Co(II)}}$, min	0–60	30
[Co(II)], mM	0.0–10.0	7.5
t_{PBP} , min	0–60	20
[PBP], $\mu\text{g mL}^{-1}$	440–1330	880
PENG–HRP, dilution	1/25–1/200	1/50

^ao/n: overnight.

Moreover, this modification took only 2.5 h which is a significant advantage with respect to the modification of gold electrodes with NTA-terminated thiolated self-assembled monolayers (SAMs) which requires 12–24 h of incubation in the thiol solutions.^{8,29}

Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , and Zn^{2+} were checked as metal ions to be coordinated with the NTA derivative attached to the electrode surface (Figure S3, Supporting Information). Similar specific-to-unspecific responses ratios were obtained using Cu^{2+} , Ni^{2+} , and Co^{2+} . However, the use of Co^{2+} allowed the regeneration of the affinity sensor as discussed below. This was attributed to the lower stability constant of the corresponding complex ($\text{p}K_{\text{a}} = 10.4$).³⁰ Furthermore, the influence of the Co^{2+} concentration used for the coordination with the immobilized NTA derivative on the amperometric response obtained in the absence of free β -lactam antibiotic was evaluated (Figure S4, Supporting Information). It can be observed as the measured current increased with the Co^{2+} concentration which confirmed that the metal ion played an essential role in the PBP binding on the modified SPCE. As expected, the amperometric response obtained when no metal ion was present was only slightly higher than the nonspecific signal resulting in the absence of immobilized His-PBP.

Analytical Characteristics of the Affinity Sensor. The performance of the integrated affinity biosensor was tested using AMP as a model target penicillin. The calibration graph constructed for AMP in P&D buffer solution containing 1.0 M NaCl is displayed in Figure 4. The DR extended between $1.3 \pm$

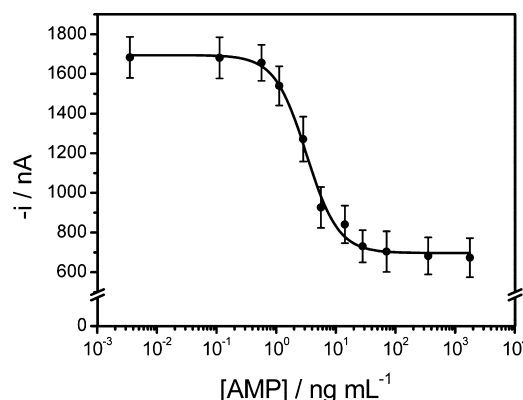


Figure 4. Calibration curve constructed with the PBP– Co^{2+} –NTA–SPCE affinity sensor for AMP in P&D buffer containing 1.0 M NaCl. The experimental points were fitted to eq 1. Error bars were estimated as a triple of the standard deviation ($n = 3$).

0.2 and 9.9 ± 0.9 ng mL^{-1} with an IC_{50} value of 3.6 ± 0.4 ng mL^{-1} and a LOD of 0.7 ± 0.1 ng mL^{-1} , which is approximately 6 times lower than the limit regulated by the EU ($4 \mu\text{g kg}^{-1}$ AMP content in milk samples). Therefore, the obtained results are promising and encouraging for the further application of the disposable amperometric affinity sensor in the analysis of food samples such as milk.

Analytical Characteristics of the Affinity Sensor in Milk Samples. The usefulness of the affinity biosensor for the determination of β -lactam antibiotics in milk was evaluated selecting a penicillin (AMP) and a cephalosporin (CEF) as target analytes. Calibration curves were obtained for both compounds in whole UHT milk with only a 1:1 dilution with P&D buffer as sample treatment. It is important to remark that the addition of 1.0 M NaCl to the buffer solution was not

needed now because, as commented before, the milk matrix components acted as an effective in situ blocking agent able to minimize the nonspecific signals.¹⁵ The obtained calibration graphs are shown in Figure 5, and the corresponding analytical

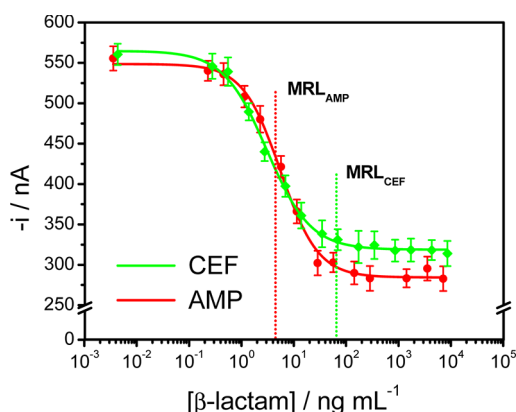


Figure 5. Calibration graphs obtained with the PBP–Co²⁺–NTA–SPCE affinity sensor for AMP and CEF in 1:1 P&D-diluted UHT whole milk. The experimental points were fitted to eq 1. Error bars were estimated as a triple of the standard deviation ($n = 3$).

characteristics are summarized in Table 2. As it can be observed in both cases the LODs are well below the MRLs established by current legislation.

Table 2. Analytical Characteristics for the Determination of AMP and CEF in 1:1 P&D Buffer-Diluted UHT Whole Milk with the PBP–Co²⁺–NTA–SPCE Affinity Biosensor

	AMP	CEF
r^2	0.996	0.997
IC ₅₀ /nM	15.6 ± 0.4	7.1 ± 0.2
IC ₅₀ /ng mL ⁻¹	5.5 ± 0.1	3.0 ± 0.1
LOD/nM	2.5 ± 0.1	0.87 ± 0.03
LOD/ng mL ⁻¹	0.89 ± 0.02	0.37 ± 0.01
MRL/ng mL ⁻¹	4.0	60.0
DR/nM	5.0 ± 0.1 to 49 ± 1	1.89 ± 0.06 to 26.8 ± 0.8
DR/ng mL ⁻¹	1.73 ± 0.04 to 17.2 ± 0.4	0.80 ± 0.02 to 11.3 ± 0.3

The reproducibility of the responses obtained with different sensors prepared in the same manner was evaluated both within and between days by performing measurements in 1:1 P&D buffer-diluted UHT whole milk spiked with the enzymatic tracer and in the absence of β -lactam antibiotics. Six different sensors prepared the same day yielded a RSD value for the steady-state current of 4.6%. Moreover, the RSD value was 5.7% for five sensors prepared in different days. These results demonstrated a good reproducibility of the affinity sensor fabrication procedure. The storage stability of the integrated affinity sensors was evaluated by preparing on the same day different PBP–Co²⁺–HS–NTA premodified SPCEs which were stored at 4 °C under dry conditions. The sensors were tested periodically by evaluating their response in a fresh solution of PENG–HRP. A control chart was constructed by taking the mean value of five measurements obtained the first working day as the central value and setting the upper and lower control limits at $\pm 3SD$ of this initial value. The responses obtained remained within the control limits for 8 days without a noticeable decrease in their original response and kept the 91.2% of it after 11 days.

Furthermore, the reversibility of the oriented immobilization of the histidine-tagged protein onto the Co²⁺–NTA-modified electrode and hence the reusability of the developed affinity sensor was also verified. In order to do that, we tested the amperometric responses obtained with four different electrodes after incubation of the PENG–HRP–PBP–Co²⁺–NTA–SPCEs during 3 h in a 50 mM phosphate solution pH 8.0 containing 300 mM NaCl, 300 mM imidazole, and 0.01% Tween20 under continuous stirring and after 40 min in deionized water. This buffer is the one recommended for reuse of His-tag-MBs. The measured currents were in all cases similar to that obtained with no enzymatic tracer which was attributed to the replacement of the histidine ligand by imidazole and, consequently, to the release of the anchored PENG–HRP. When the Co²⁺ coordination, PBP immobilization, and PENG–HRP recognition protocols were repeated with these regenerated sensors, the initial amperometric response was restored thus evidencing the specificity and reversibility of this binding approach, in contrast with the commonly used biotin–avidin immobilization which leads to irreversible anchoring of biotinylated biomolecules. Therefore, the reusability of the affinity sensors was demonstrated.

Affinity Sensor Selectivity. The selectivity of the developed affinity sensor was tested against three nontarget antibiotics (TC, SPY, and ENRO) which may be present in milk and dairy products. The amperometric signals obtained with the affinity sensor in the absence and in the presence of these potentially interfering antibiotics at two different concentration levels (0.5 and 10 μ M) in 1:1 P&D-diluted UHT whole milk were compared. The obtained results (data not shown) demonstrated that no significant cross-reactivity occurred for the three nontarget antibiotics tested even in the presence of a high excess (10 μ M). In fact, the percentages of cross-reactivity calculated from the corresponding IC₅₀ values³¹ were <1% in all cases indicating that no significant competition was produced and the remarkable group specificity of the PBP used to prepare the affinity sensor.

An important practical aspect is that MRLs are defined for β -lactams with a nonhydrolyzed β -lactam ring. Therefore, the specificity of PBP for active β -lactams should be also tested. In order to do that, we spiked milk samples with hydrolyzed AMP or CEF (according to the procedure described in Reagents and Solutions section) at two concentration levels, 10² and 10³ ng mL⁻¹. The amperometric responses obtained with the affinity sensor showed that no detectable active antibiotic residues were found in these samples demonstrating that no cross-reactivity occurred with hydrolyzed β -lactams (open-ring metabolites or degradation products).

Application to the Analysis of Spiked Milk Samples.

The amperometric affinity sensor was applied for the analysis of UHT whole milk samples (antibiotic-free) spiked with AMP at a 30 nM (~ 10.5 ng mL⁻¹) concentration level. The quantification of AMP was accomplished by interpolation of the measured current values into the calibration plot constructed for the antibiotic in the same matrix sample (Figure 5). The analysis of 10 milk samples yielded an AMP mean concentration of 10.8 ± 0.8 ng mL⁻¹ with a mean recovery of $103 \pm 8\%$ (RSD = 9.9%), the confidence interval being calculated for $\alpha = 0.05$. Taking into account the type of analysis carried out and the straightforwardness of the experimental protocol, these good results demonstrated the usefulness of the affinity sensor for the determination of β -

Table 3. Comparison of the Analytical Characteristics of the Developed Affinity Sensor with Those Reported for Other Assays for β -Lactam Antibiotics Determination^a

assay protocol	detection type	DR/ng mL ⁻¹	LOD/ng mL ⁻¹	sample	assay time (min)	ref
sample was mixed and incubated with PBP2X [*] ; after, DIG-AMPI was added and the mixture was incubated; it was injected over a sensor chip modified surface with anti-DIG	SPR		5 (PENG), 7 (AMP), 8 (AMOX), 2 (PENG)	milk (previously defatted) and raw milk (previously heated)	40	10
PBP2X is immobilized by adsorption into a microplate; after adding the sample, a bifunctional reagent is added (DIG-AMPI); the detection step uses antidigoxigenin HRP labeled	spectrophotometry			milk, meat, honey, egg	125	13
immobilization of PBP by adsorption over SPE-RC surface; the assay consists of a competitive binding assay format using PENG and 7-ACA-GOD	amperometry (+350 mV vs Ag/AgCl)		5 (PENG)	milk (50% diluted and undiluted)	6	15
competitive affinity assay using PENG-HRP on PBP-modified MBs	amperometry ($E_{app} = -0.20$ V vs Ag pseudoreference electrode)	62.0–238.1 (AMP)	14.0 (AMP)	milk (1:1 P&D diluted)	30	21
2-peptide was covalently bound to the sensor surface; the sample was mixed and incubated with 3-peptide and R39; after, 2-peptide antibody was added to the sample and the mixture was injected over a sensor surface	SPR		2.6 (buffer) 5.2 (defatted milk)	milk (previously defatted)	9	32
sample was mixed and incubated with 3-peptide and R39	SPR			milk	7	33
(a) 2-peptide antibody was added to the sample and the mixture was injected over a 2-peptide-modified sensor surface		(a) 1.5–5.0	(a) 1.2 (PENG)			
(b) 3-peptide antibody was added to the sample, and the mixture was injected over a 3-peptide-modified sensor surface			(b) 1.5 (PENG)			
sample was mixed and incubated with 3-peptide and R39	SPR			milk	7	34
(a) 2-peptide antibody was added to the sample and the mixture was injected over a 2-peptide-modified sensor surface			(a) 1.2 (PENG)			
(b) 3-peptide antibody was added to the sample and the mixture was injected over a 3-peptide-modified sensor surface			(b) 1.5 (PENG)			
competitive affinity assay using PENG-HRP on PBP-Co ²⁺ -HS-NTA-modified SPCEs	amperometry ($E_{app} = -0.20$ V vs Ag pseudoreference electrode)	1.7–17.2 (AMP) 0.8–11.3 (CEF)	0.9 (AMP) 0.4 (CEF)	milk (1:1 P&D diluted)	30	this work

^aAbbreviations: 7-ACA-GOD, 7-aminoccephalosporanic acid modified with glucose oxidase; AMOX, amoxicillin; AMP, ampicillin; DIG-AMPI, digoxigenin-labeled ampicillin; HRP, peroxidase; PBP2X^{*}, penicillin binding protein from *Streptococcus pneumoniae*; PENG, penicillin G; 3-peptide, (Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala); 2-peptide, (Ac-L-Lys-D-Ala); R39, D,D-carboxypeptidase from *Actinomyces* R39; R39^{*}, D,D-carboxypeptidase from *Streptomyces* R39; SPE-RC, screen-printed electrode with a rhodized-carbon working electrode; SPR, surface plasmon resonance.

lactam antibiotics, in a total time for the assay of approximately 30 min (once the sensor is prepared).

Comparison with Other Reported Sensors and Methodologies. The performance of the developed amperometric affinity sensor was compared with that provided by other approaches reported in the literature (Table 3). As can be seen, most of the previously developed methodologies used surface plasmon resonance (SPR) detection, whereas only two involved electrochemical transduction.^{15,21} While offering similar analytical performance some important advantages can be claimed for the approach described here against non-electrochemical methodologies. These include the inherent simplicity and much easier potential automation and miniaturization thus making the developed methodology ideal as a field-based screening tool for β -lactam detection in milk. When compared with the other available electrochemical sensors, it is important to remark that, conversely to that occurred with the only integrated affinity sensor reported until now, the nonspecific binding of the PENG–HRP conjugate was independent of the free β -lactam concentration in solution.¹⁵ Moreover, the LOD achieved is 15 times lower than that reported for an amperometric affinity PBP magnetosensor.²¹ It is worth noting also that this is the first time that an integrated amperometric sensor has been developed by immobilization of a recombinant PBP using the His-tag/M²⁺/NTA chemistry.

CONCLUSIONS

This work showed for the first time the successful, simple, and one-step modification of SPCEs with a dense monolayer of long alkyl chain NTA ligands offering an attractive platform for the development of affinity biosensors by reproducible, stable, reversible, and oriented immobilization of His-tagged recombinant proteins. Using this novel platform, an integrated amperometric affinity sensor for the specific and sensitive detection of β -lactam antibiotics in milk was developed by immobilization of a recombinant PBP on the surface of the modified SPCEs using His-tag/Co²⁺/NTA chemistry. The obtained results demonstrated the ability of the developed sensor to detect and quantify low levels of β -lactam antibiotics residues, either penicillins or cephalosporins, in milk samples in a reliable, specific, and rapid manner (30 min) with no need of complex sample treatment steps. On the other hand, it is anticipated that the simple, versatile, efficient, and fast immobilization approach developed, based exclusively on commercially available chemicals, should be useful in the reversible immobilization, with a controlled molecular orientation, of a wide variety of histidine-tagged proteins on carbon electrode surfaces without significant loss of their biological activity finding application in the development of other bioanalytical strategies of interest.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: pingarro@quim.ucm.es. Phone: +34 913944315. Fax: +34 913944329.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The financial support of the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad Research Projects, CTQ2012-34238, and the AVANSENS Program from the Comunidad de Madrid (S2009PPQ-1642) are gratefully acknowledged. Felipe Conzuelo acknowledges an FPU fellowship from the Spanish Ministry of Education.

REFERENCES

- (1) Blankespoor, R.; Limoges, B.; Schöllhorn, B.; Syssa-Magalé, J.-L.; Yazidi, D. *Langmuir* **2005**, *21*, 3362–3375.
- (2) Haddour, N.; Cosnier, S.; Gondran, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5752–5753.
- (3) Ley, C.; Holtmann, D.; Mangold, K.-M.; Schrader, J. *Colloids Surf., B* **2011**, *88*, 539–551.
- (4) Sigal, G. B.; Bamdad, C.; Barberis, A.; Strominger, J.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 490–497.
- (5) Madoz-Gurpide, J.; Abad, J. M.; Fernández-Recio, J.; Velez, M.; Vázquez, L.; Gómez-Moreno, C.; Fernández, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9808–9817.
- (6) Benson, D. E.; Conrad, D. W.; Lorimier, R. M.; Trammel, S. A.; Hellings, H. W. *Science* **2001**, *293*, 1641–1644.
- (7) Gizeli, E.; Glad, J. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3995–4001.
- (8) Valiokas, R.; Klenkar, G.; Tinazli, A.; Reichel, A.; Tampé, R.; Piehler, J.; Liedberg, B. *Langmuir* **2008**, *24*, 4959–4967.
- (9) Harris, A. G.; Hazell, S. L.; Netting, A. G. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *45*, 591–598.
- (10) Cacciatore, G.; Petz, M.; Rachid, S.; Hakenbeck, R.; Bergwerff, A. A. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *520*, 105–115.
- (11) Jamin, M.; Hakenbeck, R.; Frere, J.-M. *FEBS Lett.* **1993**, *331*, 101–104.
- (12) Fernández, F.; Hegnerová, K.; Pilarik, M.; Sanchez-Baeza, F.; Homola, J.; Marco, M.-P. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 1231–1238.
- (13) Lamar, J.; Petz, M. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *586*, 296–303.
- (14) Liu, W.; Zhang, Z.; Liu, Z. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *592*, 187–192.
- (15) Setford, S. J.; Van Es, R. M.; Blankwater, Y. J.; Kröger, S. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *398*, 13–22.
- (16) Commission Regulation (EU) No. 37/2010 of 22 December 2009. *Off. J. Eur. Communities: Legis.* **2010**, *15*/1.
- (17) Kantiani, L.; Farré, M.; Barceló, D. *Trends Anal. Chem.* **2009**, *28*, 729–743.
- (18) Babington, R.; Matas, S.; Marco, M.-P.; Galve, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 1549–1566.
- (19) Grubelnik, A.; Padeste, C.; Tiefenauer, L. *Food Agric. Immunol.* **2001**, *13*, 161–169.
- (20) Richard, C.; Balavoine, F.; Schultz, P.; Ebbesen, T. E.; Mioskowski, C. *Science* **2003**, *300*, 775–778.
- (21) Gamella, M.; Campuzano, S.; Conzuelo, F.; Esteban-Torres, M.; de las Rivas, B.; Reviejo, A. J.; Muñoz, R.; Pingarrón, J. M. *Analyst* [Online early access]. DOI: 10.1039/C3AN36727D. Published Online: Feb 1, 2013. <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/an/c3an36727d>.
- (22) Bickerstaffe, A. K.; Cheah, N. P.; Clarke, S. M.; Parker, J. E.; Perdigon, A.; Messe, L.; Inaba, A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 5570–5575.
- (23) Martin, D. S.; Weightman, P.; Gauntlett, J. T. *Surf. Sci.* **1999**, *424*, 187–198.
- (24) Enevoldsen, A. D.; Hansen, F. Y.; Dama, A.; Criswell, L.; Taub, H. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126* (104703), 1–10.
- (25) Zhao, M.; Jiang, P.; Deng, K.; Yu, A.-F.; Hao, Y.-Z.; Xie, S.-S.; Sun, J.-L. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257*, 3243–3247.
- (26) Bhinde, T.; Clarke, S. M.; Phillips, T. K.; Arnold, T.; Parker, J. E. *Langmuir* **2010**, *26*, 8201–8206.

- (27) Janek, R. P.; Fawcett, W. R.; Ulman, A. *Langmuir* **1998**, *14*, 3011–3018.
- (28) Giess, F.; Friedrich, M. G.; Heberle, J.; Naumann, R. L.; Knoll, W. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 3213–3320.
- (29) Lee, J. K.; Kim, Y.-G.; Chi, Y. S.; Yun, W. S.; Choi, I. S. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 7665–7673.
- (30) Matheus, P. R.; Abad, J. M.; Fernández, V. M. *Rev. Tec. Fac. Ing., Univ. Zulia* **2007**, *30*, 225–235.
- (31) Conzuelo, F.; Gamella, G.; Campuzano, S.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *737*, 29–36.
- (32) Gustavsson, E.; Bjurling, P.; Sternesjö, Å. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *468*, 153–159.
- (33) Gustavsson, E.; Degelaen, J.; Bjurling, P.; Sternesjö, Å. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2791–2796.
- (34) Sternesjö, Å.; Gustavsson, E. *J. AOAC Int.* **2006**, *89*, 832–837.

SUPPORTING INFORMATION

Integrated amperometric affinity biosensors using Co²⁺-tetradentate nitrilotriacetic acid modified disposable carbon electrodes. Application to the determination of β -lactam antibiotics

Felipe Conzuelo^a, María Gamella^a, Susana Campuzano^a, Paloma Martínez-Ruiz^b, María Esteban-Torres^c, Blanca de las Rivas^c, A. Julio Reviejo^a, Rosario Muñoz^c, José M. Pingarrón^{a,}*

^a Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain.

^b Departamento de Química Orgánica I, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain.

^c Laboratorio de Biotecnología Bacteriana, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, C/Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain.

Corresponding Author

* E-mail: pingarro@quim.ucm.es. Phone number: +34 913944315. Fax number: +34 913944329

CONTENTS	PAGE
Figure S1	S2
Figure S2	S2
Figure S3	S3
Figure S4	S3

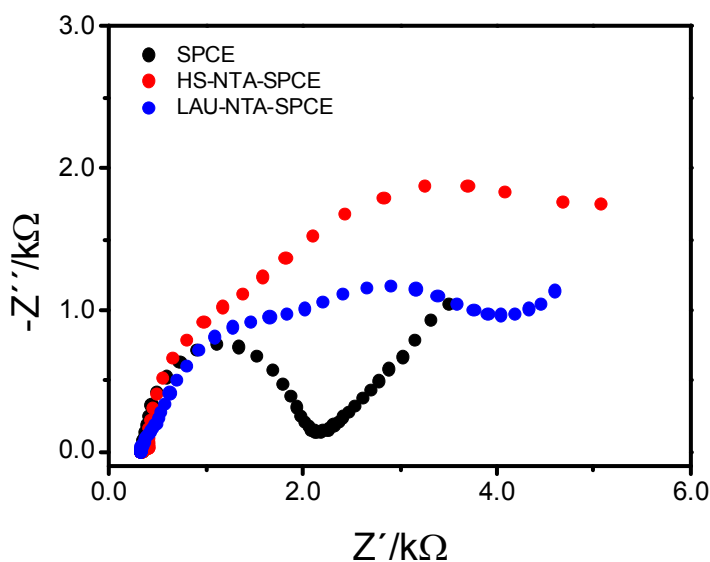


Figure S1. Nyquist plots ($-Z''$ vs Z') for the faradaic impedance measurements obtained with a bare SPCE, HS-NTA-SPCE and LAU-NTA-SPCE in a 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 solution containing 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1). EIS parameters: 0.01 – 10,000 Hz frequency range with a 0.01 V rms signal at +0.25 V (vs Ag pseudoreference electrode).

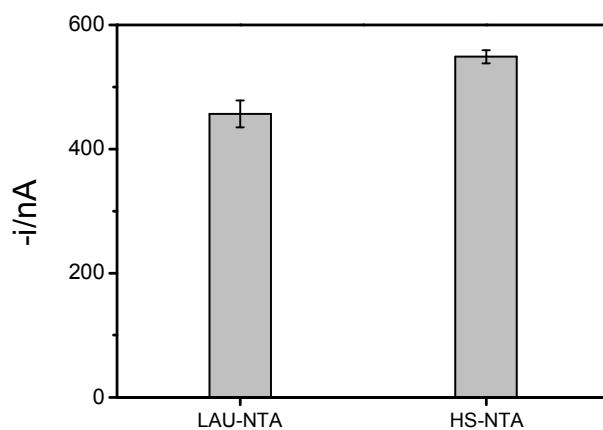


Figure S2. Amperometric responses measured at -0.20 V (vs the Ag pseudoreference electrode) for solutions containing PENG-HRP with the PBP- Co^{2+} -LAU-NTA-SPCE (1) and the PBP- Co^{2+} -HS-NTA-SPCE (2). Working media used to perform the affinity reaction: 1:1 P&D buffer-diluted UHT whole milk samples. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=5$).

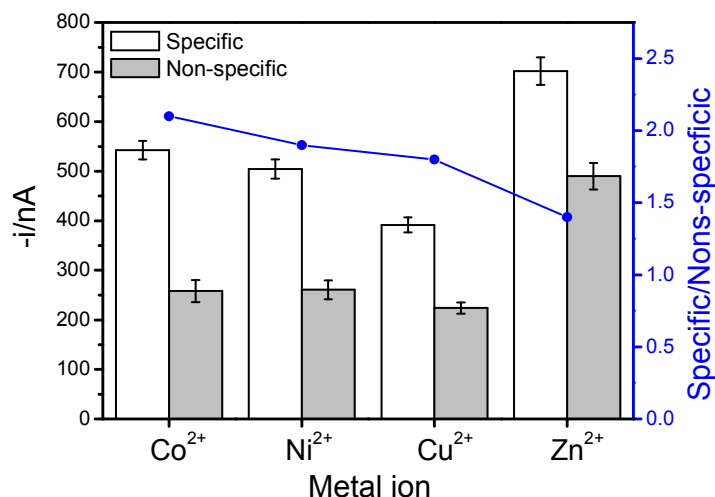


Figure S3. Dependence of the amperometric responses measured at -0.20 V for solutions containing PENG-HRP in the absence (non-specific signal) and in the presence of PBP immobilized (specific signal) as well as their corresponding ratios as a function of the metal ion (at 10.0 mM concentration) used for the coordination. Working media used to perform the affinity reaction: 1:1 P&D buffer-diluted UHT whole milk samples. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$).

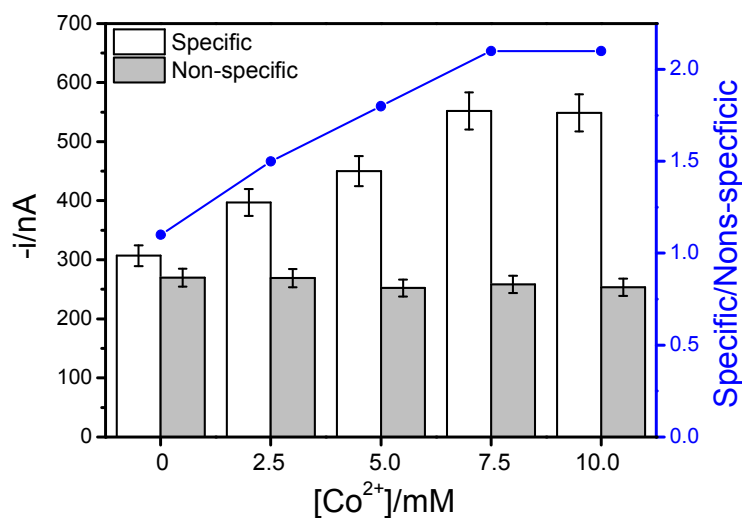


Figure S4. Dependence of the amperometric responses measured at -0.20 V for solutions containing PENG-HRP in the absence (non-specific signal) and in the presence of PBP immobilized (specific signal) as well as their corresponding ratios as a function of the Co²⁺ concentration used for the coordination. Working media used to perform the affinity reaction: 1:1 P&D buffer-diluted UHT whole milk samples. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$).

Integrated disposable electrochemical immunosensors for the simultaneous determination of sulfonamide and tetracycline antibiotics residues in milk

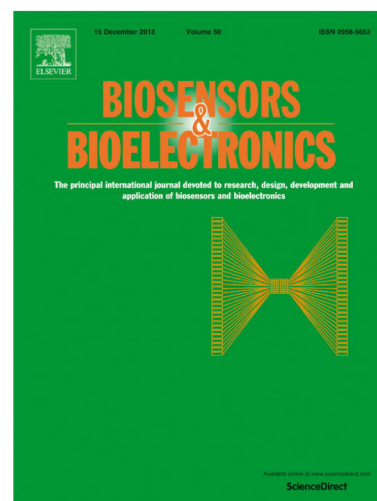
Biosensors and Bioelectronics

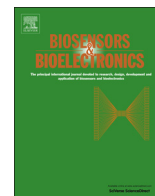
Volumen: 50

Páginas: 100 – 105

Año de publicación: 2013

DOI: 10.1016/j.bios.2013.06.019





Integrated disposable electrochemical immunosensors for the simultaneous determination of sulfonamide and tetracycline antibiotics residues in milk

Felipe Conzuelo^a, Susana Campuzano^a, María Gamella^a, Daniel G. Pinacho^b,
A. Julio Reviejo^a, M. Pilar Marco^b, José M. Pingarrón^{a,*}

^a Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Nanobiotechnology for Diagnostics (Nb4D) group, IQAC-CSIC, CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Jordi Girona 18–26, 08034 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 April 2013

Received in revised form

4 June 2013

Accepted 7 June 2013

Available online 17 June 2013

Keywords:

Sulfonamide antibiotics

Tetracycline antibiotics

Integrated immunosensor

Milk

Dual screen-printed electrodes

ABSTRACT

The design, preparation and analytical performance of a novel integrated amperometric immunosensor based on the immobilization of selective capture antibodies on the surface of Protein G-modified screen-printed dual carbon electrodes (SPdCEs) for the multiplexed determination of sulfonamide and tetracycline antibiotics residues in milk is reported in this work. Protein G was covalently immobilized onto a 4-aminobenzoic acid (4-ABA) film grafted on the disposable electrode, and a direct competitive immunoassay using horseradish peroxidase (HRP)-labeled tracers was performed. The amperometric responses measured at -0.2 V vs. the silver pseudo-reference electrode of the SPdCE upon the addition of H_2O_2 in the presence of hydroquinone (HQ) as mediator were used to monitor the extent of the immunoreactions. The developed methodology showed very low limits of detection (in the low ppb level) for sulfonamide and tetracycline antibiotics tested in untreated milk samples, and a good selectivity against other antibiotic residues frequently detected in milk and dairy products. The usefulness of the dual immunosensor was demonstrated by analyzing spiked milk samples as well as a reference milk containing a certified oxytetracycline (OTC) content. Good recoveries were attained in an analysis time of 30 min.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

At present, the occurrence of antibiotic residues in foods and foodstuffs originating from veterinary uses has become increasingly apparent. Sulfonamides (SAs) and tetracyclines (TCs) are low cost and broad spectrum antibiotics commonly used for the prevention and treatment of dairy cattle for several bacterial infections or as additives to promote growth in farm animals (Corcia and Nazzari, 2002; Koesukwiwat et al., 2007). Actually, SAs and TCs constitute 28% of the total antibiotics employed as veterinary drugs (Cháfer-Pericás et al., 2010). These antibiotics may be used singly or in combination when treating dairy cattle. Therefore, their monitoring is very important in controlling the safety of milk for human consumption because the presence of these drug residues, regardless of their minute amounts, can trigger potential adverse side effects in humans such as allergic reactions in hypersensitive individuals and other long-term health

effects, or they can be potential carcinogenic. Furthermore, prolonged exposure to residue antibiotics can result in an emergence of antibiotic-resistant strains of bacteria (Corcia and Nazzari, 2002; Adrian et al., 2008). In addition, the general residual level of antibiotics could alter the efficiency of industrial processing of raw milk toward cheese or other fermented dairy products preparation (Knecht et al., 2004). For these reasons, milk is one of the most heavily regulated foods and several control authorities such as the European Union (EU) and the U.S. Food and Drug Administration (FDA) have specified maximum residue limits (MRLs) for milk to control the levels of these antibiotics reaching the consumers (Commission of the European Communities, 1999; National Conference on Interstate Milk Shipments (NCIMS), 2005). In particular, the European Union has fixed MRLs of $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ for SA and TC antibiotics (Commission Regulation (EU) No 37/2010, 2009). An implementation of effective monitoring programs requires rapid, low cost, specific, sensitive, and reliable analytical methods able to detect drug residues below these regulated levels. Microbiological and immunological assays (Anderson et al., 1995; Moats et al., 1995) are commonly used for rapid screening of SAs and TCs. However, these techniques are complicated, lack sensitivity

* Corresponding author. Tel.: +34 913944315; fax: +34 913944329.
E-mail address: pingarro@quim.ucm.es (J.M. Pingarrón).

and specificity and thus are only suitable for semi-quantitative measurements. GC (Reeves, 1999) and CE (Chen and Gu, 1995; Fuh and Chu, 2003) methods were also reported but these techniques require preceding sample cleanup to achieve acceptable detection. The limitations of these analytical methods have generated the need for developing screening techniques for a rapid, selective and sensitive detection of antibiotic residues in animal products with a broad spectrum detection range, enough detectability and high sample throughput capabilities (Fernández et al., 2010).

The combination of advances in electrochemistry with the potential of immunochemical methods allows the implementation of electrochemical immunosensors which exhibit important advantages related with the analytical characteristics mentioned above for screening methodologies (Adrian et al., 2008; Cháfer-Pericás et al., 2010) and, therefore, emerging as attractive alternatives for the determination of antibiotics. In fact, our group has developed recently several electrochemical affinity sensors for the determination of antibiotics in milk (Conzuelo et al., 2012a; Conzuelo et al., 2012b; Gamella et al., 2013; Conzuelo et al., 2013). However, a detailed literature survey reveals that most of the reported electrochemical immunosensors are specific for the detection of each class of antibiotic. Nevertheless, there is a strong need for reliable methods for the simultaneous analysis of multi-class antibiotic residues for routine monitoring purposes. To the best of our knowledge, there is no report of an electrochemical immunosensor able to detect SAs and TCs residues in milk simultaneously.

A key consideration in the development of electrochemical immunosensors is the immobilization of capture antibodies so that an optimal orientation for binding to the corresponding antigen with minimal steric hindrance is ensured. Although the covalent binding of capture antibody amine groups to previously activated carboxylic acid terminal self-assembled monolayer (SAM) has demonstrated to be an attractive method, this is still a somewhat random process with respect to the antibody orientation. This is because the involved amine groups of the antibody reacting with the activated COOH-terminated SAM may be closely associated with the antigen binding sites, thus inhibiting the subsequent antibody-antigen interaction (Fowler et al., 2007). To prevent antibodies from binding to the monolayer through their antigen binding regions, bacterial antibody binding proteins (such as Protein A from *Staphylococcus aureus* and Protein G from group G *Streptococci*) can be attached upon activation of the surface-confined carboxyl groups through carbodiimide chemistry and formation of amide bonds (Akram et al., 2004). The feature of both bacterial proteins to selectively bind the Fc region of a wide range of immunoglobulins (IgG) with no interference to the antigen binding sites, make them very attractive as affinity-capture supports for immunosensing applications (Valat et al., 2000). In particular, Protein G (MW 17 kDa) is a cell surface protein of group C and G *Streptococci* with three Fc binding domains located near its C-terminal and exhibits specificity for subclasses of antibodies from many species (Bjoerck and Kronvall, 1984).

This paper shows, for the first time, the preparation of an integrated and dual amperometric immunosensor for the simultaneous determination of SAs and TCs antibiotics, at the low ppb concentration level, using a novel scaffold constructed by covalent binding of Protein G to pre-grafted, EDC/Sulfo-NHS activated 4-aminobenzoic acid (4-ABA) films on disposable dual screen-printed carbon electrodes (SPdCEs). The immunoreactions involved competitive binding between SAs or TCs antibiotics and HRP-labeled specific tracers for the binding sites of the capture antibodies immobilized on the working electrode surfaces. Quantification was achieved through the electrochemical monitoring of the enzyme product at the SPdCEs, using hydroquinone (HQ) as electron transfer mediator and H_2O_2 as the enzyme substrate.

Once the dual immunosensor performance was evaluated, it was successfully applied to the analysis of milk spiked at low antibiotics concentration levels as well as to a reference milk containing a certified amount of antibiotic.

2. Materials and methods

2.1. Apparatus and electrodes

Voltammetric and amperometric measurements were performed with a CHI812B bi-potentiostat (CH Instruments, Inc.) controlled by software CHI812B. All measurements were carried out at room temperature. The transducers were dual screen-printed carbon electrodes (SPdCEs) (DRP-C1110, DropSens) consisting of two elliptic carbon working electrodes (6.3 mm^2 each), a carbon counter electrode and a Ag pseudo-reference electrode. For homogenization of the fortified samples a Bunsen AGT-9 Vortex was used.

2.2. Reagents and solutions

Reagents and solutions used are described in detail in the Supporting Information.

2.3. Immunosensor preparation and immunoassay procedure

Detailed descriptions of the immunosensor preparation and the immunoassay procedure are reported in the Supporting Information.

2.4. Electrochemical measurements

The dual immunosensors were located in an electrochemical cell containing 10.0 mL of a 0.1 M phosphate buffer pH 6.0 solution and 1.0 mM HQ (prepared daily just before the electrochemical measurement). Amperometric measurements in stirred solutions were performed by applying the detection potential ($E_{\text{app}} = -0.20 \text{ V}$ vs. Ag pseudo-reference electrode) and allowing the steady-state current to be reached at both working electrodes (approx. 1 min) upon addition of 50 μL of a 0.1 M H_2O_2 solution.

2.5. Analysis of milk samples

Commercial UHT whole milk samples were 1:1-diluted with PBST and the appropriate concentration of the enzymatic tracer was added. Then, the solutions were spiked with the antibiotics SPY and TC to final concentrations of 9.6 ng mL^{-1} and 19.0 ng mL^{-1} , respectively. Aliquots (50 μL) of these spiked milk samples were analyzed following the methodology described in Section 2.3. Unspiked samples were also checked to exclude the presence of naturally contaminating antibiotics.

Furthermore, a certified reference milk containing $< 5 \mu\text{g kg}^{-1}$ OTC was also analyzed. The glass vial containing the lyophilized milk was stored at -20°C until use. According to the instructions recommended by the supplier, the material was reconstituted in deionized water by gentle stirring and mixing up to total dissolution. OTC determination was performed after spiking the reconstituted reference milk with SPY at a concentration level of 100 ng mL^{-1} or with SPY and OTC at a concentration level of 100 ng mL^{-1} each (which corresponded to the MRL value adopted by the EU legislation), and dilution with 1:1 PBST according to the procedure described in Section 2.3. The amperometric responses were interpolated into the calibration plots constructed for SPY and OTC in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk.

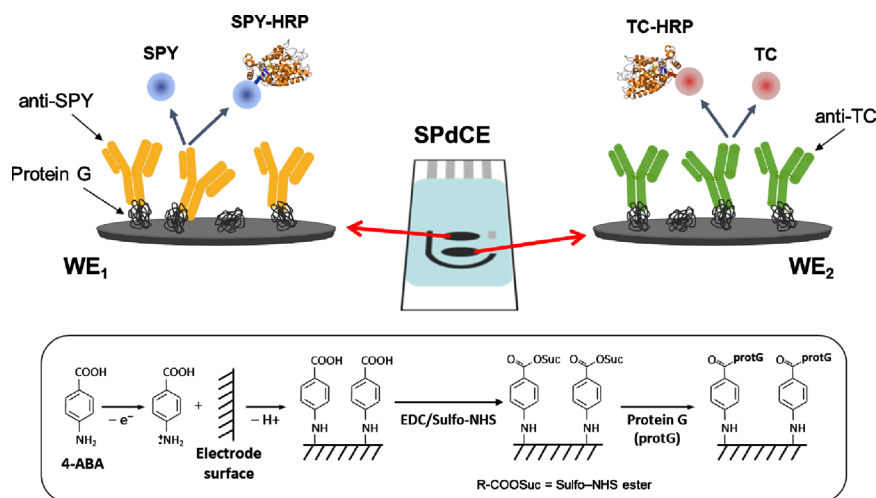


Fig. 1. Schematic display of the disposable dual immunosensor prepared for the determination of SAs and TCs antibiotics. Bottom inset: details of the surface chemistry involved in the modification of SPdCE including 4-ABA film grafting and covalent binding of Protein G using EDC and Sulfo-NHS.

3. Results and discussion

Since SAs and TCs antibiotics are low molecular weight molecules containing only one antigen determinant, competitive immunoassay configurations are mandatory for immunosensing quantification (Zacco et al., 2007). The methodologies employed in the design and preparation of the dual immunosensor is illustrated in Fig. 1. In the direct competitive schemes, the SAs and TCs antibiotics competed with a fixed concentration of the corresponding enzymatic tracers (SPY-HRP and TC-HRP, respectively) for the limited number of the antigen binding sites of the capture antibodies immobilized on each working carbon electrode surface. The immobilization was accomplished through a 4-ABA film grafted on the surface of both working electrodes involving the electrochemical oxidation of the amino group to its cation radical (Liu et al., 2000; Conzuelo et al., 2012a). Subsequently, Protein G was covalently immobilized to the 4-ABA film through the active ester method and specific capture antibodies against SAs or TCs antibiotics were immobilized in an oriented manner on this bacterial protein.

All the experiments were carried out in a 1:1 PBST-diluted UHT whole milk working medium. As it was demonstrated in a previous paper (Conzuelo et al., 2012a), this medium allowed minimizing the non-specific binding of the enzymatic tracers due to the effective *in situ* blocking of the free electrode surface by milk components (proteins, sugars and fats) during the incubation step. Moreover, this is a relevant advantage in the application of the dual immunosensor to the analysis of milk samples.

3.1. Optimization of the experimental variables

The successful grafting of the 4-ABA film and the subsequent covalent immobilization of biomolecules through the active ester method was previously evaluated and optimized (Conzuelo et al., 2012a). We compare now this methodology, immobilizing the antibodies covalently onto EDC/Sulfo-NHS activated 4-ABA film, with the results provided by immunosensors constructed performing the antibodies immobilization on randomly-oriented Staphylococcal Protein A or Streptococcal Protein G which were covalently linked to the 4-ABA film grafted on the surface of the electrodes previously. Both bacterial proteins attached the antibodies through their nonantigenic regions, leaving their antigen binding sites available with minimal steric hindrance for binding of target analyte (Fowler et al., 2007). A special feature of Proteins A and G is their xenotopic and isotopic specificities

toward immunoglobulins, broad for Protein G and relatively narrow for Protein A. Considering that the development of an immunosensor should imply a biosensing surface as universal as possible, Protein G would be a priori more appropriate than Protein A as an IgG binder. However, the affinity of the Fc binding protein for captured antibody must be also sufficiently high to limit interference with secondary antibodies or with other IgG in the sample. Since Protein A and G have their own specific advantages, both of them were checked. Fig. S1 in the Supporting information compares the amperometric signals obtained with modified electrodes prepared with (specific signals) and without (non-specific signals) immobilized antiSPY or antiTC capture antibodies using the immobilization protocols involving Protein A, Protein G or just covalent attachment onto the EDC/Sulfo-NHS activated 4-ABA film. Fig. S1a shows as the SAs immunosensor provided remarkably increased specific signals by antibody immobilization onto Protein A and Protein G (2- and 3-times, respectively). These results can be attributed to the claimed orientation controlled by these proteins because of their selective attachment to the Fc region of the antibodies (Vijayendran and Leckband, 2001; Tajima et al., 2011; Song et al., 2012). Moreover, the use of Protein G allowed a much better sensitivity to be achieved exhibiting a current ratio between the specific vs. the non-specific signals of 5.3 while it was only 3.0 when using Protein A. It is important to remark also the much better ratio observed for ProtG-EDC/NHS-4-ABA immunosensors compared with those prepared onto EDC/Sulfo-NHS activated 4-ABA film with no Protein G. In the case of TCs immunosensor (Fig. S1b), a discrimination between specific vs. non-specific signals was observed only with Protein G. According to these results, the antibodies immobilization procedure involving Protein G was selected as a suitable backbone for the development of the dual electrochemical immunosensor. It is also worth to mention that the amperometric signal obtained with the Protein G-4-ABA-modified electrode was approximately 50% larger than that measured with an electrode on which Protein G and the corresponding capture antibodies were immobilized by simple adsorption.

Other experimental variables implied in the immunosensor preparation and functioning were optimized by taking as the selection criteria the maximum current measured at -0.20 V in the absence of SAs or TCs antibiotics at the dual immunosensor. Table S1 in the Supporting information summarizes the ranges evaluated for the different variables involved as well as their selected values.

The possible diffusion of the electroactive indicator to adjacent electrodes is one of the major drawbacks to be solved in the design

of electrochemical multisensor platforms (Escamilla-Gómez et al., 2009). In order to evaluate the possible cross-talk between the two working electrodes of the SPdCE that could lead to false results, the amperometric responses measured under the optimized working conditions with the dual immunosensor were checked in the absence and presence of SPY and TC at the MRL level in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk. As it can be seen in Fig. 2, no significant cross-talking was produced at the two concentration levels assayed (i.e. 0 and 100 ppb of antibiotic) which endorse the viability of the immunosensor application for milk analysis.

3.2. Analytical characteristics of the dual immunosensor

The analytical performance of the dual immunosensor was evaluated in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk with SPY and TC as model target analytes. The calibration graphs constructed under the optimized working conditions are displayed in Fig. 3, showing the expected shape for a competitive configuration. The respective IC_{50} , LOD and DR values achieved are summarized in Table 1. It is important to remark that the LODs achieved for both analytes with the dual immunosensor fulfils the requirement for the analysis of these antibiotic residues in milk since they are approximately 1000 and 100 times lower than the limits fixed by the European legislation for SPY and TC, respectively. Interestingly, these analytical characteristics improve those obtained with electrochemical immunosensors developed for the individual determination of TC (Conzuelo et al., 2012b) and SPY (Conzuelo et al., 2012a). Table S2 in

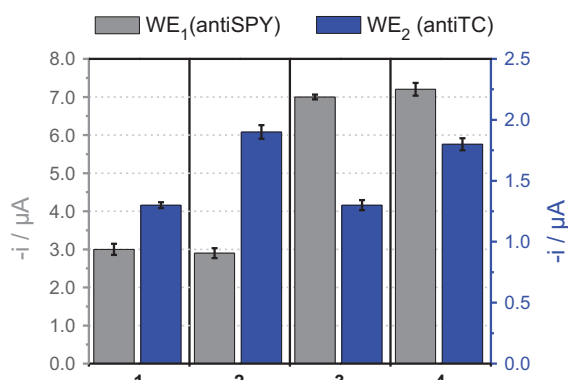


Fig. 2. Simultaneous amperometric responses measured at the dual immunosensor for: SPY and TC, 100 ng mL⁻¹ each (1); 100 ng mL⁻¹ SPY and no TC (2); 100 ng mL⁻¹ TC and no SPY (3); (4) in the absence of antibiotics. $E_{ap} = -0.20$ V vs. Ag pseudo-reference electrode. Working media: 1:1 PBST-diluted UHT whole milk. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$).

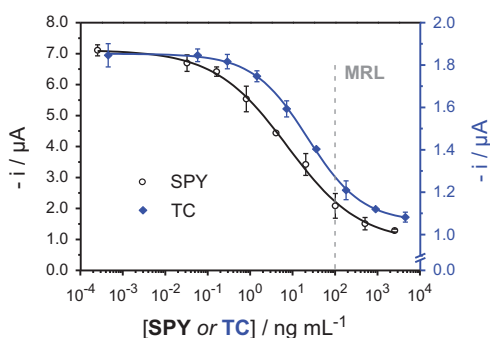


Fig. 3. Calibration curves obtained with the dual immunosensor for SPY and TC in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk. The experimental points were fitted to equation 1 (in the Supporting Information). Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$).

the Supporting information compares the analytical characteristics for SPY determination obtained with the dual immunosensor making use of the new Protein G–4-ABA based scaffold, with those of the immunosensor constructed using just a 4-ABA film format (without Protein G) (Conzuelo et al., 2012a). This comparison suggests that the Protein G scaffold permitted a favorable orientation of the capture antibody so that the antigen binding sites are readily exposed to the antigen with minimal steric hindrance, thus increasing the extent of binding and, accordingly, lowering the detection limit and widening the dynamic range of the resulting immunosensor (Fowler et al., 2007; Liu et al., 2011).

The reproducibility of the responses obtained with different immunosensors was evaluated within the same working day and for different days in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk without SPY and TC. The amperometric measurements made with 6 dual immunosensors prepared in the same day yielded RSD values of 2.1 and 1.5%. Moreover, RSD values of 3.5 and 2.4% were obtained with 4 immunosensors prepared and employed in different days with the sensing surfaces for SPY and TC, respectively. These results confirmed the reliability of the immunosensor fabrication procedure, confirming that reproducible amperometric responses can be obtained with different immunosensors constructed in the same manner.

The storage stability of the dual integrated immunosensors was evaluated by preparing on the same day different Ab-Protein G–4-ABA-SPdCEs which were dried and stored at 4 °C. Their long-term stability was tested periodically by measuring the response in a fresh solution of SPY–HRP and TC–HRP prepared in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk. A control chart was constructed by taking the mean value of 5 measurements made the first day of this study as the central value and setting the upper and lower control limits at $\pm 3 \times SD$ of this initial value. The responses obtained for both working electrodes remained within the control limits for at least 18 days (no longer period was tested) (results not shown) indicating the high stability of the prepared immunosensors under the mentioned storage conditions.

3.3. Immunosensor selectivity

Cross-reactivity against three non-target antibiotics that may be present in milk and dairy products was tested by comparing the amperometric signals obtained with the dual immunosensor in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk in the absence and presence of these potentially interfering antibiotics, both individually and in a mixture of all of them. Measurements were carried out for solutions containing both no target analytes and SPY and TC at the MRL fixed by legislation (100 ppb each). Fig. 4 shows that no significant cross-reactivity occurred for antiSPY even in the presence of a high excess (10 μ M) of PENG, CEF and ENRO and only a minor influence was observed in the presence of a mixture of non-

Table 1

Analytical characteristics obtained with the dual Protein G–4-ABA-based amperometric immunosensor for the determination of SPY and TC in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk.

	SPY	TC
r^2	0.997	0.999
IC_{50}/nM	29.5 ± 0.6	49.7 ± 0.3
$IC_{50}/ng\ mL^{-1}$	7.4 ± 0.2	22.1 ± 0.2
LOD/nM	0.39 ± 0.01	1.93 ± 0.01
LOD/ng mL ⁻¹	0.097 ± 0.002	0.858 ± 0.006
MRL/ $\mu g\ kg^{-1}$	100	100
DR/nM	1.92 ± 0.04 – 454 ± 9	6.40 ± 0.04 – 385 ± 3
DR/ng mL ⁻¹	0.48 ± 0.01 – 113 ± 2	2.84 ± 0.02 – 171 ± 1

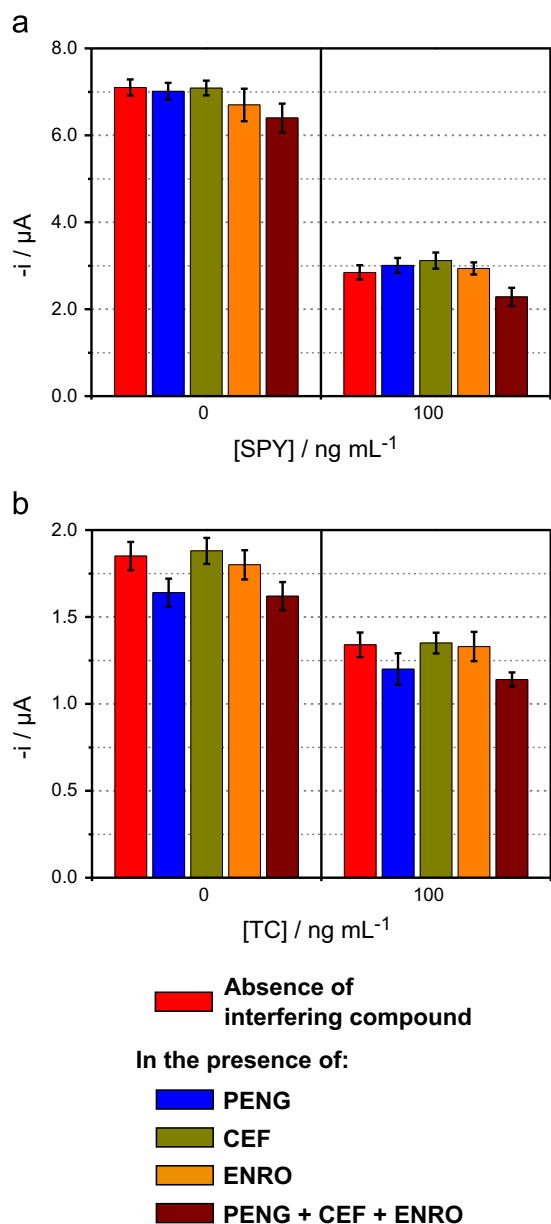


Fig. 4. Amperometric measurements obtained with the dual immunosensor in the presence of a high excess concentration (10 μM) of non-target antibiotics: PENG, CEF, ENRO and their mixture at (a) WE₁ in the absence of SPY and for 100 ng mL⁻¹ SPY; (b) WE₂ in the absence of TC and for 100 ng mL⁻¹ TC.

target antibiotics (10 μM each). Regarding the working electrode where antiTC was immobilized, only PENG at the high excess level assayed affected slightly the responses obtained with the immunosensor. Actually, the calculated percentages of cross-reactivity were < 1% for all the non-target antibiotics, thus demonstrating that no significant competition was produced and the remarkable group specificity of the capture antibodies used to prepare the integrated dual immunosensor.

3.4. Analysis of spiked milk samples

The usefulness of the dual amperometric immunosensor for the multiplexed analysis of SAs and TCs antibiotics residues was evaluated by analyzing PBST 1:1 diluted UHT whole milk (antibiotic-free) spiked with 39 nM (9.6 ng mL⁻¹) SPY and 43 nM (19.0 ng mL⁻¹) TC. Moreover, a reference material with a certified

OTC (oxytetracycline) content was also analyzed. Quantification of SPY and TC was accomplished by interpolation of the measured current values in the samples solutions into the respective calibration plot constructed for the antibiotics in the same matrix sample (Fig. 3). Similarly to that reported in a previous paper (Conzuelo et al., 2012a), the type of milk analyzed did not affect the immunosensor response. This implies that whatever milk can be used to construct the above mentioned calibration plots to interpolate the analyte response in the sample. The analysis of seven spiked milk samples yielded a SPY mean concentration of (9.4 \pm 0.4) ng mL⁻¹ with a mean recovery of (98 \pm 4)%, and a TC mean concentration of (18.6 \pm 1.3) ng mL⁻¹ with a mean recovery of (98 \pm 6)%, the confidence intervals being calculated for $\alpha=0.05$. This very good result together with the straightforwardness of the experimental protocol demonstrated fairly well the usefulness of the disposable dual immunosensor for the multiplexed determination of very low SA and TC concentrations in milk samples with practically no sample treatment. It is important also to stress that the total time for the assay was of approximately 30 min (once the immunosensor is prepared).

Furthermore, a reference material with a very low certified OTC content (< 5 μg kg⁻¹) was also analyzed. The possible existence of a matrix effect was evaluated by comparing the amperometric signals obtained for the 1:1 PBST-diluted reconstituted certified milk and whole UHT milk samples spiked with SPY at a 100 ng mL⁻¹ concentration level. The measured current values showed no significant differences independently of the sample matrix and, therefore, the determination of OTC in the certified milk could be accomplished by interpolation of the amperometric values measured for the 1:1 PBST-diluted reconstituted reference milk into the calibration plot constructed for OTC in 1:1 PBST-diluted whole UHT milk (see Fig. 5). The analysis by quintuplicate of the reference milk yielded an OTC mean content of (4.5 \pm 0.4) ng mL⁻¹, the confidence interval being calculated for $\alpha=0.05$ (RSD_{n=5}=7.9%). This value was consistent with the OTC certified content: < 5 ng mL⁻¹ OTC.

This same sample was also spiked with SPY and OTC, 100 ng mL⁻¹ each, and further analyzed. The analysis of 6 aliquots of this spiked reference milk yielded SPY and OTC mean contents of (102 \pm 3) ng mL⁻¹, RSD_{n=6}=4.2%, and (105 \pm 5) ng mL⁻¹ (once subtracted the found original OTC content), RSD_{n=6}=4.3%. The confidence intervals were calculated for $\alpha=0.05$. Therefore, all these results confirmed the suitability of the disposable dual immunosensor for the determination of very low SAs and TCs antibiotics residues in milk samples.

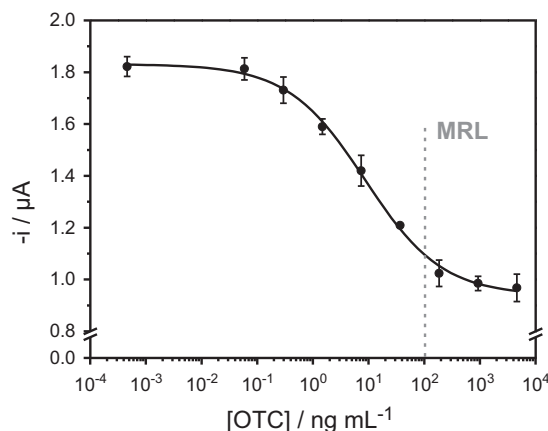


Fig. 5. Calibration curve obtained with the dual immunosensor for OTC in 1:1 PBST-diluted whole milk. The experimental points have been fitted to equation 1 (in the Supporting Information). Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$).

3.5. Comparison with other electrochemical immunosensors reported in the literature

Since this paper reports the first dual amperometric immunosensor for the simultaneous detection of SAs and TCs antibiotic residues in milk, the comparison of the analytical performance can only be made with respect to the very few electrochemical immunosensors constructed for the individual determination of each of these two antibiotic families. Only two electrochemical immunosensors have been reported for the determination of SAs in milk (Zacco et al., 2007; Conzuelo et al., 2012a). It should be mentioned that the limit of detection achieved with the dual immunosensor for SPY is better than those reported previously using an electrochemical immunosensor involving modified magnetic beads (Zacco et al., 2007) and an integrated immunosensor constructed by using a 4-ABA film based scaffold without antibody binding protein (Conzuelo et al., 2012a). Moreover, the integrated dual electrochemical immunosensor also exhibits the widest DR for the determination of SPY in these complex matrices.

Similar comments can be made regarding TCs determination, with a notably lower LOD and a wider DR exhibited by the dual immunosensor compared with the analytical characteristics reported for the only electrochemical immunosensor found in the literature for the determination of TCs which involved the immobilization of the capture antibody on the surface of Protein G-functionalized magnetic beads and the use of screen-printed carbon electrodes (Conzuelo et al., 2012b). Moreover, the time required to perform the analysis is similar to those reported for most of the previous methodologies available for detection of antibiotics residues in milk.

4. Conclusions

This work reports the first disposable and integrated dual amperometric immunosensor for the simultaneous specific and sensitive detection of SAs and TCs antibiotics in milk. The design of the immunosensor is based on the optimum alignment of specific capture antibodies in an upright position for effective binding with the target analytes. A novel scaffold prepared with Protein G covalently attached onto activated 4-ABA film-modified SPdCEs, is used for such purpose. The obtained results revealed that the immobilization strategy through Protein G has a direct impact on the sensitivity and dynamic range achievable by the immunosensor. The dual amperometric immunosensor exhibits excellent analytical performance in terms of sensitivity, selectivity, wide range of quantifiable antigen concentrations, and inter-assay reproducibility, fulfilling the requirements for milk quality control analysis. Indeed, the immunosensor allows the detection of trace SAs and TCs residues (far below the regulated levels by the EU and FDA) in samples such as milk. Therefore, this multiple-analyte immunosensor can be envisaged as a useful and affordable analytical tool to classical assays for the rapid, simple and suitable routinely analysis of milk as well as for multiresidue confirmation purposes. Moreover, the simplicity, and easy automation and miniaturization of the required instrumentation pave the way to the development of an alternative screening assay for routinely food safety, inspection control or alarm situations on remote sites.

Acknowledgments

The financial support of the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad Research Projects, CTQ2012-34238, and the AVANSENS Program from the Comunidad de Madrid (S2009PPQ-1642) are gratefully acknowledged. Felipe Conzuelo acknowledges a FPU fellowship from the Spanish Ministry of Education. This work was performed in the frame of European project Confidence (KBBE2007-211326).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.06.019>.

References

- Adrian, J., Pinacho, D.G., Granier, B., Diserens, J.-M., Sánchez-Baeza, F., 2008. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 1703–1712.
- Akram, M., Stuart, M.C., Wong, D.K.Y., 2004. *Analytica Chimica Acta* 504, 243–251.
- Anderson, K.L., Moats, W.A., Rushing, J.E., Wesen, D.P., Papich, M.G., 1995. *American Journal of Veterinary Research* 56, 70–77.
- Bjoerck, L., Kronvall, G., 1984. *Journal of Immunology* 133, 969–974.
- Cháfer-Pericás, C., Maquieira, A., Puchades, R., 2010. *Trends in Analytical Chemistry* 29, 1038–1049.
- Chen, C.L., Gu, X., 1995. *Journal of AOAC International* 78, 1369–1377.
- Commission of the European Communities, Official Journal of the European Communities, 4 March 1999. Commission Regulation (EC) No. 508/1999, L60/16.
- Commission Regulation (EU) No 37/2010, 22 December 2009. Official Journal of the European Union L 15/1.
- Conzuelo, F., Gamella, M., Campuzano, S., Martínez-Ruiz, P., Esteban-Torres, M., de las Rivas, B., Reviejo, A.J., Muñoz, R., Pingarrón, J.M., 2013. *Analytical Chemistry* 85, 3246–3254.
- Conzuelo, F., Gamella, M., Campuzano, S., Pinacho, D.G., Reviejo, A.J., Marco, M.-P., Pingarrón, J.M., 2012a. *Biosensors and Bioelectronics* 36, 81–88.
- Conzuelo, F., Gamella, M., Campuzano, S., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., 2012b. *Analytica Chimica Acta* 737, 29–36.
- Corgia, A.D., Nazzari, M., 2002. *Journal of Chromatography A* 974, 53–89.
- Escamilla-Gómez, V., Hernández-Santos, D., González-García, M.B., Pingarrón-Carrazón, J.M., Costa-García, A., 2009. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 2678–2683.
- Fernández, F., Hegnerová, K., Piliarik, M., Sanchez-Baeza, F., Homola, J., Marco, M.-P., 2010. *Biosensors and Bioelectronics* 26, 1231–1238.
- Fowler, J.M., Stuart, M.C., Wong, D.K.Y., 2007. *Analytical Chemistry* 79, 350–354.
- Fuh, M.R., Chu, S.Y., 2003. *Analytica Chimica Acta* 499, 215–221.
- Gamella, M., Campuzano, Conzuelo, F., Esteban-Torres, M., de las Rivas, B., Reviejo, A.J., Muñoz, R., Pingarrón, J.M., 2013. *Analyst* 138, 2013–2022.
- Knecht, B.G., Strasser, A., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Niessner, R., Weller, M.G., 2004. *Analytical Chemistry* 76, 646–654.
- Koesukwiwat, U., Jayanta, S., Leepipatpiboon, N., 2007. *Journal of Chromatography A* 1140, 147–156.
- Liu, J., Cheng, L., Liu, B., Dong, S., 2000. *Langmuir* 16, 7471–7476.
- Liu, X., Zhao, R., Mao, W., Feng, H., Liu, X., Wong, D.K.Y., 2011. *Analyst* 136, 5204–5210.
- Milk Safety References, National Conference on Interstate Milk Shipments (NCIMS), 27 September 2005.
- Moats, W.A., Anderson, K.L., Rushing, J.E., Wesen, D.P., 1995. *American Journal of Veterinary Research* 56, 795–800.
- Reeves, V., 1999. *Journal of Chromatography B* 723, 127–137.
- Song, H.Y., Zhou, X., Hobley, J., Su, X., 2012. *Langmuir* 28, 997–1004.
- Tajima, N., Takai, M., Ishihara, K., 2011. *Analytical Chemistry* 83, 1969–1976.
- Valat, C., Limoges, B., Huet, D., Romette, J.-L., 2000. *Analytica Chimica Acta* 404, 187–194.
- Vijayendran, R.A., Leckband, D.E., 2001. *Analytical Chemistry* 73, 471–480.
- Zacco, E., Adrian, J., Galve, R., Marco, M.-P., Alegret, S., Pividori, M.I., 2007. *Biosensors and Bioelectronics* 22, 2184–2191.

SUPPORTING INFORMATION

Integrated Disposable Electrochemical Immunosensors for the Simultaneous Determination of Sulfonamide and Tetracycline Antibiotics Residues in Milk

Felipe Conzuelo^a, Susana Campuzano^a, María Gamella^a, Daniel G. Pinacho^b, A. Julio Reviejo^a, M. Pilar Marco^b, José M. Pingarrón^{a,*}

^aDepartamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain. E-mail: pingarro@quim.ucm.es. Phone number: +34 913944315. Fax number: +34 913944329

^bNanobiotechnology for Diagnostics (Nb4D) group, IQAC-CSIC, CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Jordi Girona 18 – 26, 08034 Barcelona, Spain.

SUPPORTING INFORMATION

CONTENTS	PAGE
Reagents and solutions	S2-S3
Immunosensor preparation	S3-S4
Immunoassay procedure	S4-S5
Fig. S-1	S5
Table S-1	S6
Table S-2	S6
References	S7

Reagents and solutions

All the reagents used were of the highest available grade. 4-Aminobenzoic acid (4-ABA) was purchased from Acros Organics. LiClO₄, Tween[®] 20, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC), *N*-hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS), hydroquinone (HQ), hydrogen peroxide (30 %, w/v), tetracycline hydrochloride (TC), oxytetracycline hydrochloride (OTC), Protein A (from *S. aureus*) and Protein G recombinant (from *E. coli*) were purchased from Sigma-Aldrich. Sulfapyridine (SPY), penicillin G sodium salt (PENG), cefapirin sodium salt (CEF) and enrofloxacin (ENRO) were from Fluka. 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) was acquired from GERBU Biotechnik, GmbH. Ethanol absolute, sodium dihydrogen phosphate, di-sodium hydrogen phosphate, potassium chloride, sodium chloride, sodium hydrogen carbonate and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Scharlau. Stock solutions (10 mM) of different antibiotics were prepared in DMSO (SPY and ENRO), in PBST (TC and PENG) or in carbonate buffer (OTC) and kept at 4 °C. Antibiotic standard solutions for immunosensor calibration purposes were prepared daily upon dilution of the stock solutions in 1:1-PBST diluted milk.

Immunoreagents used for SAs determination, polyclonal antiserum As167 (antiSPY) and enzyme tracer SA7-HRP (SPY-HRP), as well as their production and purification procedures were described in detail in reference [Conzuelo et al., 2012].

Polyclonal sheep antiTC antibody (ab30591) was obtained from Abcam. Horseradish peroxidase-conjugated tetracycline (TC-HRP) was acquired from Abiox.

For the COOH functionalization of the SPdCEs, an anhydrous ethanol solution containing 3 mM 4-ABA and 0.1 M LiClO₄ was used [Liu et al., 2000], [Conzuelo et al., 2012].

For the activation of the 4-ABA film grafted on the SPdCE, an EDC/Sulfo-NHS mixture solution (100 mM each, in MES buffer pH 6.0) was used [Conzuelo et al., 2012].

All buffer solutions were prepared with Milli-Q water (18 M Ω cm at 25 °C). MES buffer is 0.05 M MES, pH 6.0. Phosphate-buffered saline (PBS) is 0.01 M phosphate buffer solution containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl, pH 7.5. PBST is PBS with 0.05 % Tween[®] 20. Carbonate buffer is 0.05 M carbonate buffer solution, pH 9.6.

Whole UHT milk samples were purchased in a local supermarket. A certified lyophilized milk, ERM[®]-BB493 (LGC Standards), containing < 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ OTC, was also analyzed.

Immunosensor preparation

A three-step coupling was performed, i.e. grafting of the SPE surface using 4-aminobenzoic acid (4-ABA) with formation of COOH moieties, activation of these functions with EDC/NHS, and covalent binding of Protein G via a peptide bond [Valat et al, 2000]. Specific antibodies were captured on these Protein G-modified electrode surfaces. First, a film of 4-aminobenzoic acid (4-ABA) was grafted onto the carbon working electrode surface by amine cation radical formation (see Fig. 1, bottom inset) [Liu et al., 2000], [Conzuelo et al., 2012]. Briefly, the electrochemical modification was performed by immersing the SPCE in the 4-ABA solution described in *Section 2.2* and recording 3 cyclic voltammograms at 10 mV s⁻¹ between 0.0 and 1.0 V (*vs.* Ag pseudo-reference electrode). Coupling of amino residues of Protein A or G to the -COOH moieties of the SPCdE surface was carried out by placing a 5 μL drop of the EDC/Sulfo-NHS mixture onto each working electrode and allowing reaction to proceed for 30 min at room temperature in a humid incubation chamber. After the modification, the electrode was rinsed with Milli-Q water and dried under a nitrogen stream. A 5 μL drop of Protein G solution (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in PBST) was dropped on the activated electrodes and incubated at room temperature during 20 min in a humid incubation chamber. The electrode was then washed with PBST to remove any unbound protein and dried under a nitrogen stream.

Thereafter, a 5 μL -aliquot of the corresponding capture antibody solution was dropped on the surface of the working electrodes modified with Protein G: antiSPY ($\sim 300 \mu\text{g mL}^{-1}$ in PBST) on WE₁ and antiTC ($285 \mu\text{g mL}^{-1}$ in PBST) on WE₂ (see Fig. 1) and incubated at room temperature for 90 min in a humid incubation chamber. Thereafter, the electrode was washed with PBST to remove any unbound antibody and dried under a nitrogen stream. The immunosensors were stored at 4 °C in a Petri dish and could be used until 18 days after their preparation without any significant decrease in their response.

Immunoassay procedure

The analyte solutions (prepared in 1:1 PBST-diluted milk) containing the appropriate concentration of the enzymatic tracer and the desired concentration of the antibiotic(s) were vortexed to ensure adequate mixing. In order to carry out the competitive assay, a 50 μL aliquot of this mixture solution was dropped on the immunosensor surface (covering the 2 working electrodes) and incubated at room temperature for 30 min in a humid incubation chamber. Thereafter, the electrode was thoroughly washed with PBST and the electrochemical measurement was carried out to evaluate the extent of the immunoreactions. Calibration curves with SPY and TC standards were prepared in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk. The experimental data were fitted to a four-parameter logistic equation (sigmoidal) according to:

$$y = i_1 + \frac{i_2 - i_1}{1 + 10^{(\log \text{IC}_{50} - x) \cdot p}} \quad (1)$$

where i_1 is the minimum amperometric signal, i_2 is the maximal amperometric signal, IC_{50} is the concentration producing 50 % of the maximal amperometric signal and p is the Hill slope at the inflection point of the sigmoid curve. The limit of detection (LOD) was calculated as the analyte concentration for which the enzymatic tracer binding to the antibody was inhibited

by 10 %. The dynamic range (DR) was considered as the interval of analyte concentrations for which the inhibition of the enzymatic tracer binding was between 20 and 80 %.

Unless otherwise indicated, the presented data corresponded to the average of at least three replicates and the confidence intervals were calculated for $\alpha = 0.05$.

Fig. S-1. Amperometric responses (and their corresponding ratios) measured at -0.20 V (vs. the Ag pseudoreference electrode) for SPY–HRP (a) or TC–HRP (b) solutions with sensors prepared without (non-specific signal) and with immobilized antiSPY (a) or antiTC (b) (specific signal) as a function of the antibody immobilization protocol used. [Protein A] = [Protein G] = $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$).

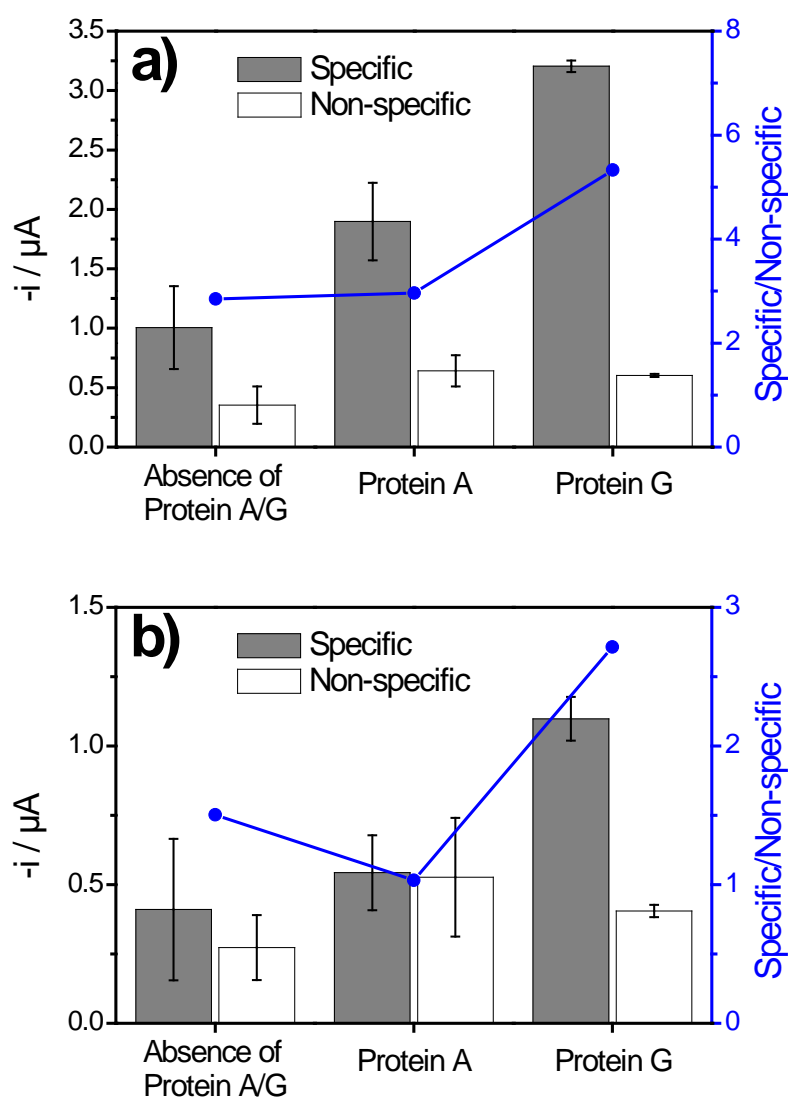


Table S-1. Optimization of experimental variables.

Experimental variable	Checked range	Selected value
[Protein G], $\mu\text{g mL}^{-1}$	10 – 50	10
Incubation time with Protein G, min	10 – 90	20
[antiSPY], $\mu\text{g mL}^{-1}$	200 – 500	300
[antiTC], $\mu\text{g mL}^{-1}$	200 – 500	285
Incubation time with antibodies, min	30 – 120	90
[SPY–HRP], $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.5 – 5.0	5.0
TC–HRP, dilution	1/50 – 1/200	1/50

Table S-2. Comparison of the analytical characteristics obtained with amperometric immnosensors using 4–ABA and Protein G–4–ABA-modified SPEs for the detection of SPY in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk.

	4–ABA [Conzuelo et al, 2012]	Protein G–4–ABA (This work)
r^2	0.996	0.997
IC_{50} / nM	54.69	29.5
IC_{50} / ng mL^{-1}	13.63	7.4
LOD / nM	1.77	0.39
LOD / ng mL^{-1}	0.44	0.097
MRL / $\mu\text{g kg}^{-1}$	100	100
DR / nM	6.29 – 475.65	1.92 – 454
DR / ng mL^{-1}	1.6 – 118.6	0.48 – 113

References

- Conzuelo, F., Gamella, M., Campuzano, S., Pinacho, D.G., Reviejo, A.J., Marco, M.-P.,
Pingarrón, J.M. 2012. *Biosens. Bioelectron.* 36, 81 – 88.
- Liu, J., Cheng, L., Liu, B., Dong, S. 2000. *Langmuir* 16, 7471 – 7476.
- Valat, C., Limoges, B., Huet, D., Romette, J.-L. 2000. *Anal. Chim. Acta* 404, 187 – 194.

Detection and quantification of sulfonamide antibiotic residues in milk using scanning electrochemical microscopy

Electroanalysis

Volumen: 26

Páginas: 481 – 487

Año de publicación: 2014

DOI: 10.1002/elan.201300577



Detection and Quantification of Sulfonamide Antibiotic Residues in Milk Using Scanning Electrochemical Microscopy

Felipe Conzuelo,^[a, b] Lutz Stratmann,^[a] Stefanie Grützke,^[a] José M. Pingarrón,^[b] and Wolfgang Schuhmann*^[a]

Abstract: The use of scanning electrochemical microscopy (SECM) for the qualitative and quantitative determination of sulfapyridine (SPY) in milk is described. A direct competitive immunoassay was performed involving an antibiotic horseradish peroxidase (HRP)-labeled analog and using selective capture antibodies immobilized on the surface of Protein G-modified glassy carbon

plates. SECM detection was accomplished by means of the sample generator/tip collector (GC) mode involving the reduction of benzoquinone (BQ) generated upon the HRP-catalyzed oxidation of hydroquinone (HQ) at the modified substrate surface in the presence of H₂O₂. The detection limit for SPY in milk samples was as low as 0.13 ng mL⁻¹.

Keywords: Carbon surface modification • Integrated immunosensor • Milk • Scanning electrochemical microscopy • Sulfonamide antibiotics

1 Introduction

Antibiotics are active substances commonly used against infectious diseases produced by bacteria, but they can also improve feed efficiency and enhance growth rates in animals [1]. For these reasons antimicrobial drugs are widely used in veterinary medicine. However, either by illegal use or by non-compliance of producers to existing animal-treatment protocols, residues of antibiotics may enter the food chain [2]. Regardless of their minute amounts, the presence of antibiotic residues in foods from animal origin can generate adverse side effects, such as the risk of chemical poisoning, allergic reactions in hypersensitive persons, and the development of antibiotic-resistant strains of bacteria [3,4]. The milk and dairy products industries are among the sectors most affected by the presence of antibiotic residues. Apart from the serious consequences to human and animal health, they can provoke important economic losses derived from the inhibitory effect of these drugs in fermentation processes implied in the production of cheese and cultured milk products [5–7].

Among different antibiotic families, sulfonamides are widely used in veterinary medicine due to their broad-spectrum antimicrobial activity and low cost [3,7,8]. The importance of the determination of sulfonamides residues in milk and milk products relies not only in the previous mentioned consequences, but also in the reported potential carcinogenic activity of these compounds [9,10]. Therefore, monitoring of milk for the presence of antibiotics to prevent contaminated milk from entering the food chain is of great importance [11]. Several control authorities such as the European Union (EU) and the U.S. Food and Drug Administration (FDA) have specified

maximum residue limits (MRLs) to control levels of these antibiotics in milk [12,13]. In particular, the European Union has stated a MRL of 100 µg kg⁻¹ for the combined total residues of all substances within the sulfonamide group [12].

Scanning electrochemical microscopy (SECM) is a powerful scanning probe technique that allows high resolution imaging of electrochemical processes and is also capable to provide quantitative information on the electrochemical properties of a surface. SECM allows the development of miniaturized analytical devices, biosensor arrays, and chip based testing systems [14], and can be used for the fabrication, optimization and characterization of enzymatic sensors, either if the enzyme is the primary recognition element or if it is used as a label to mark a binding event [15].

SECM has been successfully used to investigate biological systems on electrified interfaces such as enzymes [16–20], cells [21–23], and DNA hybridization events [24–27], as well as immuno-complexes [14,28–36]. However, the evaluation and quantification of low molecular weight analytes is still challenging. Holmes and co-workers [14] demonstrated using label-free interrogation of antibody-antigen interactions that the detectability was decreasing

[a] F. Conzuelo, L. Stratmann, S. Grützke, W. Schuhmann
Analytische Chemie – Elektroanalytik & Sensorik, Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstr. 150, D-44780 Bochum, Germany
tel: +49 234 3226200, fax: +49 234 3214683
*e-mail: wolfgang.schuhmann@rub.de

[b] F. Conzuelo, J. M. Pingarrón
Departamento de Química Analítica, Facultad de CC.
Químicas, Universidad Complutense de Madrid
Avda. Complutense s/n, E-28040 Madrid, Spain

with the molecular weight of the analyte. Moreover, a significant interference was reported for the determination of the antibiotic ciprofloxacin in milk, which affected the performance of the assay and made quantification of the analyte impossible [14]. Other attempts in visualization of immunocomplexes by means of SECM only succeeded upon saturation of the antigen binding sites with a labeled antigen [28], or by using labeled antibodies for imaging and mapping of surfaces [21,22,37,38].

In this communication, SECM was applied for detection and quantification of sulfonamides antibiotics residues in milk taking advantage of a direct competitive immunoassay with selective capture antibodies and a HRP-labeled analog. The sample generator/tip collector mode of SECM was used for monitoring benzoquinone (BQ) generated in the HRP-catalyzed oxidation of hydroquinone (HQ) in the presence of H_2O_2 . To the best of our knowledge, this is the first report on the application of SECM for achieving quantitative information for a low molecular weight analyte involved in immunological reactions.

2 Experimental

2.1 Chemicals and Solutions

All chemicals were of analytical grade and used as received. 4-Aminobenzoic acid (4-ABA) was purchased from Merck. Ethanol abs., Tween20, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC), *N*-hydroxy-succinimide (NHS), and recombinant Protein G (from *E. coli*) were purchased from Sigma-Aldrich. Sulfapyridine (SPY) and *p*-benzoquinone (BQ) were from Fluka. NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KCl, NaCl, and H_2O_2 (30%, w/v) were purchased from J. T. Baker. LiClO_4 was from Acros Organics. Hydroquinone (HQ) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were acquired from Riedel-de Haën. A 10 mM stock solution of SPY was prepared in DMSO and stored at 4 °C until use. Antibiotic standard solutions were prepared daily by dilution of the stock solution in 1:1-PBST (see below) diluted UHT whole milk.

Polyclonal antiserum As167 (antiSPY) and its enzyme labeled analog SA7-HRP (SPY-HRP), as well as their production and purification procedures were described in detail elsewhere [39].

The -COOH functionalization of glassy carbon plates was carried out with an anhydrous ethanol solution containing 3 mM 4-ABA and 0.1 M LiClO_4 [39,40]. Activation of the 4-ABA film grafted on the glassy carbon surfaces was accomplished by means of an EDC/NHS solution (100 mM each, in deionized water).

All buffer solutions were prepared with bi-distilled deionized water. PBST is a 0.01 M phosphate buffer solution containing 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, and 0.05 % Tween20 (pH 7.5).

Whole UHT milk samples were purchased in a local supermarket.

2.2 Immunoassay Protocol

SIGRADUR G Glassy carbon plates (HTW Hochtemperatur-Werkstoffe) were used as substrates. They were cleaned by polishing with alumina pastes (LECO) of different grain sizes (1, 0.3 and 0.05 μm) in a Forcipol 1 V polishing machine (Metkon) and rinsed with triply distilled deionized water and with ethanol in an ultrasonic bath.

The carbon plates were surface modified with a 4-ABA film grafted by amine cation radical formation (Figure 1a) [39,40]. Briefly, the electrochemical modification was performed by immersing the plates in the 4-ABA solution and recording 3 cyclic voltammograms in the potential range between 0.0 and 1.0 V (vs. Ag/AgCl/3 M KCl) at 10 mVs^{-1} . Protein G was then coupled to the surface confined -COOH moieties on the modified carbon surface through the active ester method. For this, the modified glassy carbon plate was immersed in an EDC/NHS solution allowing the reaction to proceed for 45 min at room temperature. Thereafter, the plate was rinsed with deionized water and dried under an air stream. Then, a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ protein G solution in PBST was dropped on the activated plate and incubated at room temperature for 20 min. The plate was washed with PBST to remove any unbound protein and dried under an air stream. A 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ antiSPY solution in PBST was then dropped on the surface of the Protein G-modified plates and incubated at room temperature for 90 min. The plates were then washed with PBST to remove any unbound antibody and then dried under an air stream.

Analyte solutions were prepared in 1:1 PBST-diluted milk containing a fixed concentration of the enzymatic tracer (SPY-HRP, 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and the desired concentration of the antibiotic. In order to carry out the competitive assay, 0.5 μL aliquots of these solutions were dropped on the modified plate surface and incubated at room temperature for 30 min in a humid incubation chamber. Thereafter, the plate was thoroughly washed with PBST.

2.3 SECM Experiments

SECM approach curves and imaging were done in a three electrode setup using a carbon fiber UME as working electrode, a Ag/AgCl/3 M KCl electrode as reference electrode, and a Pt wire as counter electrode. Polymer-insulated carbon fiber electrodes (\varnothing 5–8 μm) were prepared according to a published procedure [41–43]. A cathodic electrodeposition paint (EDP, ClearClad HSR401 from LVH coatings) was used for insulation. Precipitation of the soluble polymer was accomplished by applying a constant cathodic potential of 6 V for 1 min between the carbon fiber electrode and a ring-shaped Pt counter electrode. Subsequently, heat curing was performed in an oven for 30 min at 190 °C.

The SECM set-up has been described previously [44,45]. The main components are step-motor driven micrometer screws (Owis) for positioning of the SECM tip

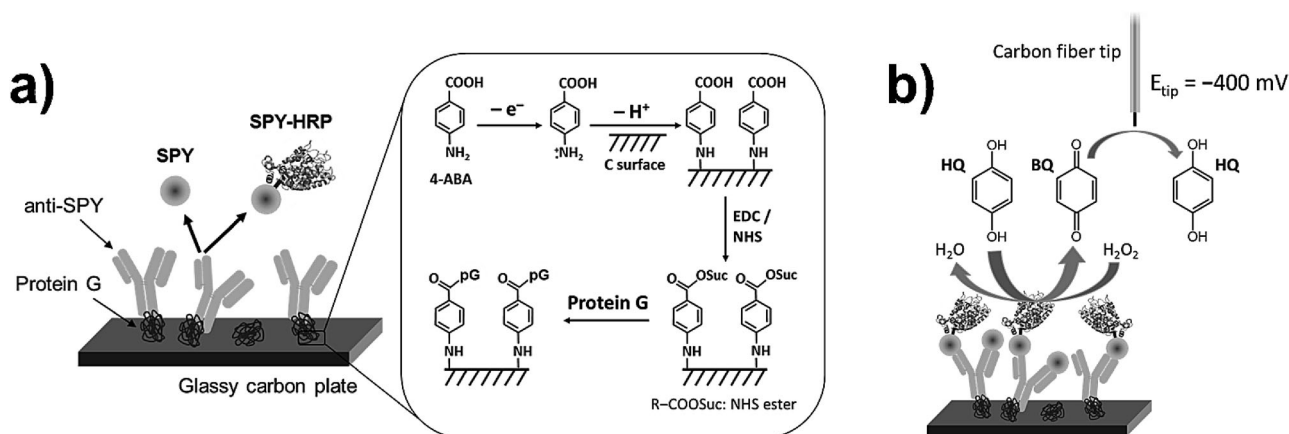


Fig. 1. Schematic representation of the steps involved in the immunoassay interrogation by SECM for detection and quantification of SPY antibiotic residues. a) Details of the surface chemistry involved in the modification of glassy carbon plates, including 4-ABA film grafting and covalent binding of Protein G using EDC/NHS chemistry. b) Schematic diagram detailing the principle of the sample generator/tip collector (GC) mode of SECM used for interrogating the locally immobilized HRP after the immunoassay binding event.

in x - y - z directions, a potentiostat and an in-house written control software programmed using Visual Basic 6.0. SECM measurements were performed with a modified Sensolytics SECM system including a Hi-Res module with a 16 bit CIO-DAS 1602/16 AD/DA board (Plug-In electronics) and a LC-3C Petit Ampère potentiostat (Bio-analytical Systems).

1 mL of 2 mM HQ in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) was placed in the electrochemical cell on the modified glassy carbon plate. The carbon fiber tip was then polarized at +800 mV (vs. Ag/AgCl/3 M Cl⁻), a potential sufficient for the oxidation of HQ to BQ, and a z -approach curve was recorded. When the tip current began to decrease the approach of the SECM tip was stopped and it was retracted by 1000 μm in order to prevent tip crash and any damage of the modified surface. Then, 1 mL of 2 mM H₂O₂ was supplemented, resulting in an electrolyte solution containing 1 mM HQ and 1 mM H₂O₂ in which z -approach curves and SECM surface scans were conducted. The carbon fiber tip was biased at -400 mV (vs. Ag/AgCl/3 M Cl⁻) to invoke electrochemical reduction of BQ generated at the modified surface through the HRP-catalyzed reaction in presence of H₂O₂ (see Figure 1b). z -approach curves were recorded over the functionalized surfaces with a scan speed of 20 $\mu\text{m s}^{-1}$.

For distance control during SECM imaging, the SECM tip was approached to the surface at three x -, y -coordinates and the tilt of the sample surface plane was calculated. Imaging an area of 7000 by 3000 μm^2 a grid with 50 μm x -increments and 100 μm y -increments was predefined. Between the grid points the SECM tip was moved with a tip velocity of 100 $\mu\text{m s}^{-1}$. The tip rested 200 ms at the predefined grid point before recording a current value. The tip-to-sample distance was maintained at 15 μm .

3 Results and Discussion

The methodologies employed in the design and preparation of the immunoassay on the glassy carbon plates are illustrated in Figure 1a. In the used direct competitive scheme, the SPY antibiotic competes with a fixed concentration of the enzyme-labeled analog SPY-HRP for the limited number of the antigen binding sites of the capture antibodies immobilized on the glassy carbon surface. The immobilization was accomplished through a 4-ABA film grafted on the surface of glassy carbon plates by electrochemical oxidation of the amino group to its radical cation [39,40].

As it shown previously, the surface was subsequently modified with Protein G covalently coupled to the 4-ABA film through the active ester method, and the specific capture antibodies were immobilized in an oriented manner on this bacterial protein [46]. Working in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk medium during the competition step allowed minimizing the non-specific binding of the enzyme-labeled SPY-analog due to the effective in-situ blocking of the carbon surface by milk components [39]. This additionally allows to apply the developed immunosensor for the analysis of SPY in milk samples.

Although the feedback mode of SECM allows higher lateral resolution, the sample generator/tip collector (GC) mode is more sensitive due to negligible background currents detected at the tip, thus increasing the signal to noise ratio [18,20]. Therefore, in the proposed scheme, the substrate HQ was catalytically converted by the enzyme HRP in the presence of H₂O₂ to BQ, which was monitored with the positioned carbon fiber tip in the GC mode of SECM as depicted in Figure 1b.

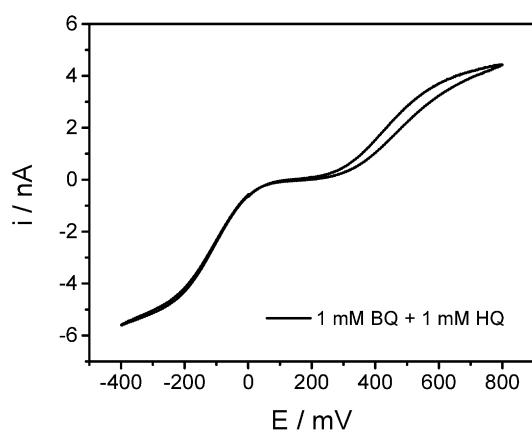


Fig. 2. Cyclic voltammogram recorded with a carbon fiber tip in 0.1 M phosphate buffer solution (pH 6.0) containing 1 mM BQ and 1 mM HQ. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Potentials recorded against an Ag/AgCl/3 M KCl reference electrode.

3.1 Electrochemical Behavior of the HQ/BQ System at a Carbon Fiber Tip in the GC Mode of SECM

The BQ/HQ couple exhibits a quasi-reversible redox behavior and negligible electrode fouling [32,47]. Although different electrode materials were previously used for SECM experiments monitoring BQ reduction [18,20,32], in contrast to Pt tips [48] coreduction of molecular oxygen as well as of H_2O_2 at carbon fiber electrodes is not possible at the applied potentials. By comparing cyclic voltammograms of 1 mM BQ in the absence and presence of 1 mM H_2O_2 (data not shown), reduction of H_2O_2 was observed at potentials more negative than -200 mV (vs. Ag/AgCl/3 M Cl^-) at a Pt tip, while no effect was observed with a carbon fiber microelectrode. Figure 2 shows a typical cyclic voltammogram for 1 mM BQ and 1 mM HQ in phosphate buffer 0.1 M (pH 6.0) at a carbon fiber SECM tip. A steady-state reduction current of BQ at potentials more negative than -200 mV , and a steady-state oxidation current of HQ at potentials more positive than 600 mV can be distinguished. Accordingly, the tip was biased to $+800 \text{ mV}$ (vs. Ag/AgCl/3 M Cl^-) for its positioning during a z -approach curve to the modified surfaces in HQ-containing electrolyte, and to -400 mV for BQ reduction during the GC mode SECM experiments.

3.2 Z-Approach Curves Towards the Modified Surfaces

In the GC mode of SECM, the electroactive species generated in the enzyme reaction diffuses away from the surface and is detected at the tip. When the tip is positioned directly above an active enzyme region, the faradaic current increases as the tip approaches to the modified surface (Figure 3).

Upon z -approach to the surface the cathodic current increases to a maximum value before exhibiting a sharp decrease when the tip is in very close proximity of the modified surface. The increase in current can be ex-

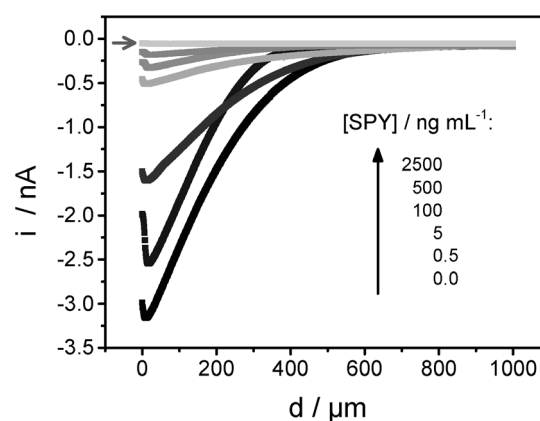


Fig. 3. z -approach curves recorded on different SPY/SPY–HRP competition spots fabricated with solutions containing a fixed amount of SPY–HRP and variable SPY concentrations. The z -approach curve indicated with the gray arrow was performed above an unmodified region of the glassy carbon plate. $E_{\text{tip}} = -400 \text{ mV}$ (vs. Ag/AgCl/3 M Cl^-). Electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) containing 1 mM HQ and 1 mM H_2O_2 . Approach speed: $20 \mu\text{m s}^{-1}$.

plained by the generation of BQ in the enzyme reaction and the diffusion profile established from the sites of the immobilized enzyme towards bulk solution.

In close proximity between tip and sample surface, the diffusion of formation of BQ is decreased due to the negative feedback effect hindering the diffusion of HQ and H_2O_2 into the gap between tip and sample surface resulting in a decrease in the recorded cathodic current.

In order to evaluate the capability of the proposed system for quantification of SPY, approach curves were recorded with the tip positioned above spots fabricated with solutions containing different SPY concentrations in the presence of a fixed amount of SPY–HRP. As shown in Figure 3 the cathodic current traces decreased as the concentration of SPY increased demonstrating the successful immunochemical competition process.

An approach curve was also conducted with the tip positioned above an unmodified region of the glassy carbon plate. No increase of the tip current was observed (approach curve denoted with a gray arrow in Figure 3), endorsing that the raise of tip current was originated by BQ reduction, generated in the HRP-catalyzed reduction of H_2O_2 .

3.3 Quantitative Determination of SPY in Milk

Sulfapyridine was selected as a model target sulfonamide antibiotic for evaluating the possibility of its quantification by using SECM. Quantification was accomplished by recording approach curves and plotting the dependence of the measured reduction currents as a function of the SPY concentration in the different spots. These experiments were conducted using glassy carbon plates modified with the capture antibodies and with spots of several SPY/SPY–HRP competition mixture solutions. The maxi-

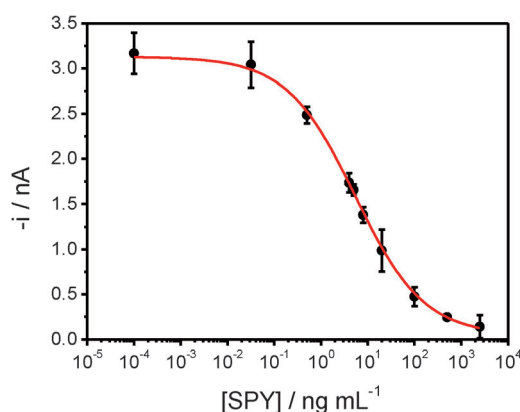


Fig. 4. Calibration curve obtained by plotting the maximal cathodic current from the different recorded approach curves as a function of SPY concentration in 1:1 PBST-diluted UHT whole milk. The experimental points were fitted to Equation 1. Error bars were estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$).

imum current values were taken which were obtained at a distance of 15 μm from the sample surface for all spots.

A calibration plot for SPY in 1:1 PBST-diluted milk was constructed (Figure 4) and fitted to a four-parameter logistic equation according to:

$$y = i_1 + (i_2 - i_1) / [1 + 10 \log (IC_{50} - x)^p] \quad (1)$$

where i_1 is the minimum amperometric signal, i_2 is the maximal amperometric signal, IC_{50} is the concentration producing 50% of the maximal amperometric signal and p is the Hill slope at the inflection point of the sigmoid curve. The calibration plot ($r^2=0.999$) exhibited the expected shape for a competitive immune assay with a dynamic range between (0.5 ± 0.2) and (56 ± 8) ng mL^{-1} SPY, considered as the interval of analyte concentrations for which the inhibition of the enzymatic tracer binding was between 20 and 80%. The IC_{50} value is (5.4 ± 0.9) ng mL^{-1} . The limit of detection (LOD) is (0.13 ± 0.05) ng mL^{-1} and was calculated as the analyte concentration for which the enzymatic tracer binding to the antibody was inhibited by 10%. It is important to point out that this LOD value is far below the LMR suggested by current European legislation (100 ppb of total sulfonamide content in milk samples), fulfilling the required detectability for the analysis of this kind of antibiotic residues in milk. Moreover, the relative standard deviation (RSD) of the method, calculated from the maximum cathodic current obtained (i.e., for spots created in the absence of free SPY) was 2.4% ($n=3$). This result confirmed the reliability of the approach involving SECM interrogation, demonstrating that reproducible responses could be obtained with different samples modified in the same manner.

3.4 Imaging of Modified Surfaces

An area scan was also accomplished with the aim of visualizing the variations of SPY concentrations between different spots of different enzymatic activity as well as within one spot. Imaging of modified SPY/SPY-HRP competition spots was achieved by scanning the carbon fiber tip across the surface while applying a cathodic potential of -400 mV (vs. Ag/AgCl/3 M Cl^-) for the reduction of enzymatically generated BQ. A constant tip-surface distance of 15 μm was used by employing automatic tilt correction during scanning, the distance at which the maximum cathodic current values were obtained in the z -approach curves recorded previously.

The SECM image obtained for four spots of different competition mixture solutions is shown in Figure 5. The recorded currents clearly demonstrated that differentiation among spots prepared from different SPY concentrations is possible and as expected higher cathodic currents were measured for lower SPY concentrations.

Quantification of SPY was attempted from lines extracted from the image shown in Figure 5. Figure 6 shows

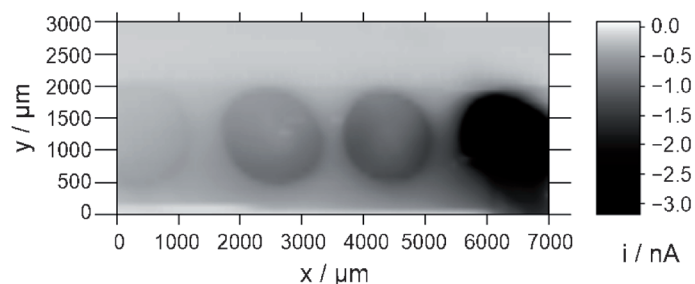


Fig. 5. SECM image of four competition spots on a modified glassy carbon plate, prepared after incubation with solutions of variable SPY concentration and a fixed amount of SPY-HRP. From left to right: 2500, 20, 5, and 0 ng mL^{-1} SPY. Scan rate: 100 $\mu\text{m s}^{-1}$ between grid points. $E_{\text{tip}} = -400$ mV (vs. Ag/AgCl/3 M Cl^-). Electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) containing 1 mM HQ and 1 mM H_2O_2 . Distance between tip and surface: 15 μm .

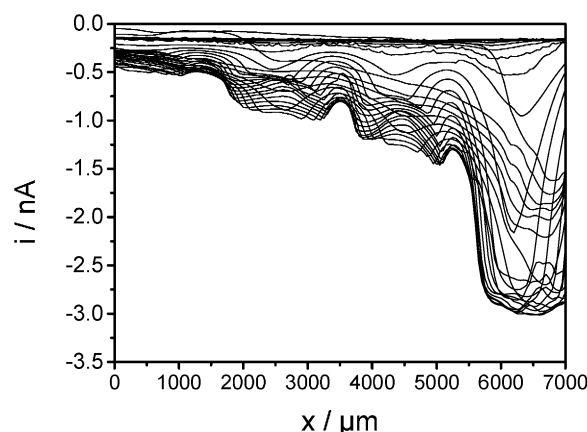


Fig. 6. SECM line scans extracted from the image shown in Figure 5. The four spots were prepared with, from left to right: 2500, 20, 5, and 0 ng mL^{-1} SPY.

all *x*-line scans separated by a distance of 100 μm in *y*-direction projected to a 2D representation of the tip current over the *x*-position. The maximum current values recorded at the tip while positioned over the different spots agree very well with the current values previously obtained in the *z*-approach curves.

This type of analysis can provide a faster and simpler interrogation of the immunosensing platform, allowing the determination of the analyte concentration from multiple samples.

4 Conclusion

The sample generator/tip collector mode of SECM can be successfully applied to quantitatively interrogate an immunosensing platform. Although the main goal of the present work was to evaluate and characterize the enzyme immunoassay, as well as to demonstrate that detection and quantification of low molecular weight analytes is possible with SECM, the excellent reproducibility of the assay, as well as the possibility of realizing rapid measurements through a line scan on spots prepared with different sample solutions, highlight the ability of SECM to be used as an efficient analytical tool for the reliable quantification of low molecular analytes such as sulfonamides.

While screening methods are used for the analysis of a large number of samples, more complex methodologies are used in the reliable confirmation of positive results. Other most commonly applied methods for sulfonamide antibiotics determination are HPLC- [9] and ELISA-based [49] methods, which require skilled personnel, complex sample treatment and tedious procedures. The excellent analytical performance of the proposed assay in terms of sensitivity, with a LOD for SPY of 0.13 ng mL^{-1} , far below the MRL defined by the current European Legislation, along with the simplicity of the proposed immunoplatfrom suggests the possibility of an alternative SECM-based detection method to be implemented.

Acknowledgements

The work was in part financially supported by the *Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)* within the Project Taschentuchlabor (03IS2201F). The authors are grateful to Prof. *M.-Pilar Marco* (Nb4D Group, Barcelona, Spain) for providing the immunoreagents used for sulfonamides determination. Felipe Conzuelo acknowledges a *FPU* fellowship from the *Spanish Ministry of Education*.

References

- [1] A.-C. Huet, T. Fodey, S. A. Haughey, S. Weigel, C. Elliott, P. Delahaut, *Trends Anal. Chem.* **2010**, 29, 1281–1294.
- [2] K. Zhu, J. Li, Z. Wang, H. Jiang, R. C. Beier, F. Xu, J. Shen, S. Ding, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 26, 2716–2719.
- [3] A. D. Corcia, M. Nazzari, *J. Chromatogr. A* **2002**, 974, 53–89.
- [4] J. Adrian, D. G. Pinacho, B. Granier, J.-M. Diserens, F. Sánchez-Baeza, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 1703–1712.
- [5] E. Zacco, J. Adrian, R. Galve, M.-P. Marco, S. Alegret, M. I. Pividori, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 2184–2191.
- [6] H. Font, J. Adrian, R. Galve, M.-C. Estévez, M. Castellari, M. Gratacós-Cubarsí, F. Sánchez-Baeza, M.-P. Marco, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 736–743.
- [7] J. Adrian, H. Font, J.-M. Diserens, F. Sánchez-Baeza, M.-P. Marco, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 385–394.
- [8] U. Koesukwiwat, S. Jayanta, N. Leepipatpi boon, *J. Chromatogr. A* **2007**, 1140, 147–156.
- [9] A. A. M. Stolker, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* **2005**, 1067, 15–53.
- [10] S. Wang, H. Y. Zhang, L. Wang, Z. J. Duan, I. Kennedy, *Food Addit. Contam.* **2006**, 23, 362–384.
- [11] S. R. Raz, M. G. E. G. Bremer, W. Haasnoot, W. Norde, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 7743–7749.
- [12] Commission Regulation (EU), *Official J. Euro. Union* **2010**, 37, L15/1–L15/72.
- [13] National Conference on Interstate Milk Shipments (NCIMS), *Milk Safety References*, 27 September **2005**.
- [14] J. L. Holmes, F. Davis, S. D. Collyer, S. P. J. Higson, *Anal. Chim. Acta* **2012**, 741, 1–8.
- [15] W. S. Roberts, D. J. Lonsdale, J. Griffiths, S. P. J. Higson, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 23, 301–318.
- [16] G. Wittstock, T. Wilhelm, *Anal. Sci.* **2002**, 18, 1199–1204.
- [17] J. Zhou, C. Campbell, A. Heller, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 4007–4010.
- [18] X. Li, Q. Geng, Y. Wang, Z. Si, W. Jiang, X. Zhang, W. Jin, *Electroanalysis* **2007**, 19, 1734–1740.
- [19] G. Valenti, L. Bardini, D. Bonazzi, S. Rapino, M. Marcaccio, F. Paolucci, *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 22165–22170.
- [20] W. S. Roberts, F. Davis, S. D. Collyer, S. P. J. Higson, *Analyst* **2011**, 136, 5287–5293.
- [21] Y. Takahashi, T. Miyamoto, H. Shiku, R. Asano, T. Yasukawa, I. Kumagai, T. Matsue, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 2785–2790.
- [22] W. S. Roberts, F. Davis, J. L. Holmes, S. D. Collyer, L. D. Larcombe, S. L. Morgan, S. P. J. Higson, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 41, 282–288.
- [23] M. Nebel, S. Grützke, N. Diab, A. Schulte, W. Schuhmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 6335–6338.
- [24] E. Fortin, P. Mailley, L. Lacroix, S. Szunerits, *Analyst* **2006**, 131, 186–193.
- [25] I. Palchetti, S. Laschi, G. Marrazza, M. Mascini, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 7206–7213.
- [26] Z. Zhang, J. Zhou, A. Tang, Z. Wu, G. Shen, R. Yu, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 25, 1953–1957.
- [27] H. Fan, F. Jiao, H. Chen, F. Zhang, Q. Wang, P. He, Y. Fang, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 47, 373–378.
- [28] G. Wittstock, K.-J. Yu, H. B. Halsall, T. H. Ridgway, W. R. Heineman, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 3578–3582.
- [29] a) C. A. Wijayawardhana, G. Wittstock, H. B. Halsall, W. R. Heineman, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 333–338; b) C. A. Wijayawardhana, G. Wittstock, H. B. Halsall, W. R. Heineman, *Electroanalysis* **2000**, 12, 640–644.
- [30] S. Kasai, A. Yokota, H. Zhou, M. Nishizawa, K. Niwa, T. Onouchi, T. Matsue, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 5761–5765.
- [31] S. Kasai, H. Shiku, Y.-S. Torisawa, K. Nagamine, T. Yasukawa, T. Watanabe, T. Matsue, *Anal. Chim. Acta* **2006**, 566, 55–59.
- [32] X. Zhang, X. Peng, W. Jin, *Anal. Chim. Acta* **2006**, 558, 110–114.
- [33] T. Yasukawa, Y. Hirano, N. Motochi, H. Shiku, T. Matsue, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 3099–3104.

- [34] W. Song, Z. Yan, K. Hu, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *38*, 425–429.
- [35] J. L. Holmes, F. Davis, S. D. Collyer, S. P. J. Higson, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *689*, 206–211.
- [36] L. Stratmann, M. Gebala, W. Schuhmann, *Chem. Phys. Chem.* **2013**, *14*, 2198–2207.
- [37] H. Shiku, T. Matsue, I. Uchida, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1276–1278.
- [38] A. Anne, A. Chovin, C. Demaille, M. Lafouresse, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 7924–7932.
- [39] F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, D. G. Pinacho, A. J. Reviejo, M.-P. Marco, J. M. Pingarrón, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *36*, 81–88.
- [40] J. Liu, L. Cheng, B. Liu, S. Dong, *Langmuir* **2000**, *16*, 7471–7476.
- [41] A. Schulte, R. H. Chow, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3054–3058.
- [42] A. Schulte, R. H. Chow, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 985–990.
- [43] L. P. Bauermann, W. Schuhmann, A. Schulte, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 4003–4008.
- [44] C. Kranz, M. Ludwig, H. E. Gaub, W. Schuhmann, *Adv. Mater.* **1995**, *7*, 38–40.
- [45] B. Ballesteros Katemann, A. Schulte, W. Schuhmann, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2025–2033.
- [46] F. Conzuelo, S. Campuzano, M. Gamella, D. G. Pinacho, A. J. Reviejo, M.-P. Marco, J. M. Pingarrón, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *50*, 100–105.
- [47] H. Fan, F. Jiao, H. Chen, F. Zhang, Q. Wang, P. He, Y. Fang, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *47*, 373–378.
- [48] I. Katsounaros, W. B. Schneider, J. C. Meier, U. Benedikt, P. U. Biedermann, A. A. Auer, K. J. J. Mayrhofer, *Phys. Chem. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 7384–7391.
- [49] H. Zhang, S. Wang, *J. Immunol. Meth.* **2009**, *350*, 1–13.

Received: November 24, 2013

Accepted: December 31, 2013

Published online: February 13, 2014

**Rapid screening of multiple antibiotic residues in milk using
disposable amperometric magnetosensors**

Analytica Chimica Acta

En prensa

DOI: 10.1016/j.aca.2014.03.005

En preparación:

- **Interrogation of immunoassay platforms by SERS and SECM after enzyme-catalyzed silver deposition**
- **Immunologic-controlled biofuel cell as a self-powered biosensor for antibiotic residues determination**